



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de ecoregiones de la costa del Perú con actividad larvicida para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L)

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga**

AUTOR

Ingrid Nathalie RAMIREZ ORTIZ

ASESOR

Dr. Abad FLORES PAUCARIMA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ramirez, I. (2019). *Aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas de Bacillus thuringiensis aisladas de ecoregiones de la costa del Perú con actividad larvica para Aedes (Stegomyia) aegypti (L)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 14:40 horas del 02 de abril de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de INGRID NATHALIE RAMIREZ ORTIZ.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 022-EPMP-2018, el titulado expuso su tesis: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* AISLADAS DE ECOREGIONES DE LA COSTA DEL PERÚ CON ACTIVIDAD LARVICIDA PARA *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L)", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota .../...7..., calificativo: Aprobado con mención honrosa

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga a INGRID NATHALIE RAMIREZ ORTIZ y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 02 de abril de 2019.

Mg. JULIA CASTRO HIDALGO
(PRESIDENTA)

Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
(ASESOR)

Mg. MARIO ALCARRAZ CURI
(MIEMBRO)

Mg. TITO SANCHEZ ROJAS
(MIEMBRO)

Se lo dedico a mi madre, porque es la persona que más amo.

*A mi padre, por darme ánimos en todo momento y ser un ejemplo de perseverancia y
valentía.*

A mi tío Jim, por ser un gran apoyo y guía.

A mis familiares ya que sin sus consejos de vida sería difícil formarme como persona.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Doctor Abad Flores por los consejos brindados, por los materiales y medios y darme la oportunidad de realizar esta tesis.

Al Instituto Nacional de Salud, especialmente a los integrantes del Laboratorio de Referencia Nacional de Entomología por la amena capacitación.

A mis revisores y profesores, la Mg. Julia Castro Hidalgo, el Mg. Tito Libio Sánchez y el Mg. Mario Alcarraz Curi por las correcciones y sugerencias, especialmente al profesor Tito Libio por el préstamo de equipos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología por los momentos gratos, especialmente a Hammer Lino, Alejandro Patiño y Jessi por la ayuda brindada para la realización de la tesis.

A los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por las enseñanzas a lo largo de los 5 años de mi carrera, especialmente a la profesora Elena Quillama Polo por iniciarme en el amor por la investigación y al Dr. Abad Flores Paucarima.

A mi alma máter, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por formarme como profesional.

Y finalmente, al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado por el financiamiento parcial de la tesis.

ABREVIATURAS

Bt: Bacillus thuringiensis

LB: medio Luria-Bertani

INS: Instituto Nacional de Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de base

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

L3: Larvas de *Aedes aegypti* del tercer estadio

INDICE GENERAL

RESUMEN	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	17
MARCO TEÓRICO.....	19
Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
Características de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de Bt.....	22
Caracterización molecular de Bt.	23
Determinación de la toxicidad de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
Aislamiento de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> de diferentes ecosistemas.	26
Características generales del vector: <i>Aedes aegypti</i>	27
Resistencia de larvas de <i>Aedes aegypti</i> a los insecticidas.	28
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31

Material Biológico	31
Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> a partir de muestras de larvas muertas, agua y suelo.	31
1.1 Elección de las zonas de muestreo.	31
1.2 Procesamiento de la muestra	36
1.2.1 Prueba de movilidad.	37
1.2.2 Prueba de crecimiento en 5, 7 y 8% de NaCl	37
1.2.3. Hidrólisis del Almidón.....	37
1.2.4. Prueba de la Catalasa	38
1.2.5 Análisis de la morfología del cristal de <i>Bt</i>	38
1.2.6 Conservación de las cepas	38
1.2.7 Índice de <i>Bacillus thuringiensis</i>	38
2. Selección cualitativa de las cepas nativas de <i>Bt</i> que posean propiedades entomocidas para <i>Aedes aegypti</i> y determinación cuantitativa de la actividad larvívora de las cepas nativas	39
2.1 Crianza de <i>Aedes aegypti</i> para el bioensayo cualitativo	39
2.2 Preparación del complejo espóra-cristal para el bioensayo cualitativo de las cepas nativas	39
2.3 Bioensayo cualitativo de las cepas nativas.....	40
2.4 Evaluación cuantitativa de la actividad larvívora; Bioensayos	40
3. Identificación molecular de los genes <i>cry4Aa</i> , <i>cry11Aa</i> y <i>cyt1Aa</i>	41
3.1 Extracción de ADN de <i>Bt</i>	41
3.2 Cuantificación de ADN.....	42
3.3 Amplificación de los genes <i>cry4Aa</i> , <i>cry11Aa</i> y <i>cyt1Aa</i>	42
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES.....	72

RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo por cada distrito

Tabla 2. Cebadores usados en la reacción de PCR para los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa* de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla 3. Porcentaje de muestras de agua, tierra y larvas muertas que contienen *Bacillus thuringiensis*

Tabla 4. Índice de *Bacillus thuringiensis* en muestras de agua recolectadas en el distrito de Catacaos-Piura

Tabla 5. Incidencia de *Bacillus thuringiensis* en muestras de agua, larvas y tierra recolectadas en el distrito de Sullana-Piura

Tabla 6. Incidencia de *Bacillus thuringiensis* en muestras de agua tomadas en el distrito de Morropon-Piura

Tabla 7. Incidencia de *Bacillus thuringiensis* en muestras de aguas estancadas en el distrito de José Leonardo Ortiz- Chiclayo, Lambayeque.

Tabla 8. Incidencia de *Bacillus thuringiensis* en muestras de aguas estancadas en el distrito de Chorrillos- Lima

Tabla 9. Características culturales de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en Agar Nutricio, Agar PEMBA, Agar Hi Crome y Caldo Nutricio

Tabla 10. Presencia cristales parasporales de cepas nativas a partir de Agar Nutricio, Agar PEMBA y Agar Hi Crome por la coloración azul de comasie.

Tabla 11. Morfología del cristal parasporal de cepa a partir de Agar Nutricio, Agar PEMBA, Agar Hi Crome

Tabla 12. Pruebas bioquímicas diferenciales de cepas de *Bacillus thuringiensis*

Tabla 13. Bioensayo cualitativo de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra larvas de *Aedes aegypti*

Tabla 14. Valores de LC 50 y LC 90 de las cepas nativas y la cepa patrón contra larvas de tercer estadio *Aedes aegypti*.

Tabla 15. Genes *cry 4aa*, *cry11aa* y *cyt1aa* detectados en cepas de *Bacillus thuringiensis* nativos y su mortalidad para *Aedes aegypti* después del bioensayo cualitativo

Tabla 16. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt ChiIA* para la dilución -3.

Tabla 17. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt ChiIA* para la dilución -4.

Tabla 18. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt ChiVIA* para la dilución -3.

Tabla 19. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt ChiVIA* para la dilución -4.

Tabla 20. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt LimVIIA* para la dilución -3.

Tabla 21. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt LimVIIA* para la dilución -4.

Tabla 22. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt LimVIII E* para la dilución -1.

Tabla 23. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt LimVIII E* para la dilución -2

Tabla 25. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa

nativa *Bt LimVIII E* para la dilución -3.

Tabla 24. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa nativa *Bt LimVIII E* para la dilución -4.

Tabla 26. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa patrón *Bt HD-500* para la dilución -3.

Tabla 27. Porcentaje acumulativo de mortalidad larvaria de *Aedes aegypti* con la cepa patrón *Bt HD-500* para la dilución -4.

Tabla 28. Valores de concentraciones letales de la cepa nativa *Bt Chil.A* contra larvas de tercer estadio *Aedes aegypti* mediante el análisis probit

Tabla 29. Valores de concentraciones letales de la cepa nativa *Bt ChiVI.B* contra larvas de tercer estadio *Aedes aegypti* mediante el análisis probit

Tabla 30. Valores de concentraciones letales de la cepa nativa *BT LimVII.A* contra larvas de tercer estadio *Aedes aegypti* mediante el análisis probit

Tabla 31. Valores de concentraciones letales de la cepa nativa *Bt LimVIII.E* contra larvas de tercer estadio *Aedes aegypti* mediante el análisis probit

Tabla 32. Valores de concentraciones letales de la cepa patrón HD-500 contra larvas de tercer estadio *Aedes aegypti* mediante el análisis probit

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Espora y cristal parasporal entomocida de *B. thuringiensis*. (A) Célula completamente esporulada que contiene la espora no deformante (Sp) y el cristal (Cr). Foto tomada de Bulla, 1977.

Fig. 2. Microfotografía electrónica de *Bacillus thuringiensis* después de 11 horas de incubación. a, espora libre; c, forma vegetativa de la bacteria distribuida en cadenas; e, cristal proteico libre. Magnificación, 22,500X (B). Imagen tomada de Manasherob et al. (1998).

Fig. 3. Modo de acción de *Bacillus thuringiensis* en Lepidoptera: ingestión de la bacteria (1); solubilización de los cristales (2); activación de la proteína (3); unión de las proteínas a los receptores (4); formación del poro de membrana y lisis celular (5). Imagen tomada de Schünemann et. al (2014).

Fig. 4. Puntos de muestreo en el distrito Leonardo Ortiz- Chiclayo, Lambayeque

Fig. 5. Puntos de muestreo en el distrito Catacaos, Narihualá. Piura.

Fig. 6. Puntos de muestreo en el distrito Sullana, Piura.

Fig. 7. Puntos de muestreo en el distrito Morropón, Piura.

Fig. 8. Porcentaje de muestras que contienen *Bt*

Fig. 9. Porcentaje de muestras de agua, tierra y larvas muertas que contienen *Bt*.

Fig. 10. Porcentaje *Bacillus thuringiensis* de las cepas de *Bacillus* sp. aisladas

Fig. 11. Índice de *Bt* de muestras recolectadas en las ecorregiones de Piura, Lambayeque y Lima

Fig. 12. Características culturales de la cepa *B. thuringiensis* Chil.A en Agar Nutritivo vista al estereoscopio. Lectura a las 24 horas. Se observan colonias aplanadas, de borde irregular, color blanco grisáceo y de aspecto farinoso.

Fig. 13. Características culturales de la cepa *B. thuringiensis* ChiVI.B (Arriba) y la cepa *B. thuringiensis* Chil.A en agar Hicrome después de 48 horas de incubación. Se observan colonias aplanadas, de bordes irregulares, azuladas por la alcalinización del medio dado que las cepas no fermentan el manitol presente en el medio.

Fig. 14. Características culturales de las cepas nativas de *B. thuringiensis* en agar Pemba después de 48 horas de incubación. Se observan colonias aplanadas, de bordes irregulares, azuladas por la alcalinización del medio dado que las cepas no fermentan el manitol presente en el medio.

Fig. 15. Coloración Azul de Comasie de la cepa *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E a partir de agar PEMBA a las 48 horas de incubación. Aumento 1000x. Se observan las esporas (E) y los cristales circulares libres (C).

Fig. 16. Observación de la morfología de los cristales parasporales en microscopio óptico, aumento 1000x de cultivos esporulados de *Bacillus thuringiensis* aislados de muestras de agua y tierra del Perú. Las flechas negras indican la ubicación de la espora (E) y los cristales parasporales (C). Las cepas provenientes de Piura (a) SulMa16A.1, (b) CatNa5A.1 y (c) CatNa2.A.2 producen cristales circulares pequeños con apariencia de gorro los cuales no presentan actividad toxica para *Aedes aegypti*. Las cepas provenientes de Chiclayo y Lima (d) producen cristales circulares que si presentan actividad tóxica para larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*.

Fig. 17. Actividad amilasa de las cepas *Bacillus thuringiensis* ChiVIB (arriba) y *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E (abajo), lectura a la 48 horas.

Fig. 18 Mortalidad de las cepas nativas de *Bt* contra *Aedes aegypti* para el ensayo cualitativo

Fig. 19. Relación de toxicidad de las cepas nativas de *Bt* con la cepa patrón *Bt* HD-500

Fig. 20. Evaluación de la integridad del ADN de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Carril 1: Control Negativo; Carril 2: cepa HD-500; Carril 3: cepa H14; Carril 4: cepa *Bacillus thuringiensis* Chil.A; Carril 5: cepa *Bacillus thuringiensis* ChiVI.B; Carril 6: *Bacillus thuringiensis* LimVII.A; Carril 7: *Bacillus thuringiensis* LimVIII.A; Carril 8: *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E

Fig. 21. Amplificación del gen *cry4Aa* de las cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas. Carril 1: Control negativo; Carril 2: *Bacillus thuringiensis* HD-500; Carril 3: *Bacillus thuringiensis* H14; Carril 4: Marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Promega); Carril 5: *Bt* Chil.A, Carril 6: *Bt* ChiVI.B; Carril 7: *Bt* LimVII.A, Carril 8: *Bt* LimVIII.A; Carril 9: *Bt* LimVIII.E

Fig. 22. Amplificación del gen *cry11Aa* de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Ladder 1Kb Promega; Carril 3: *Bt* Chil.A, Carril 4: *Bt* ChiVI.B; Carril 5: *Bt* LimVII.A, Carril 6: LimVIII.A; Carril 7: *Bt* LimVIII.E.

Fig. 23. Amplificación del gen *cyt1Aa* de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Ladder 1Kb; Carril 3: *Bt* Chil.A, Carril 4: *Bt* ChiVI.B; Carril 5: *Bt* LimVII.A, Carril 6: LimVIII.A; Carril 7: *Bt* LimVIII.E.

Fig. 24. Muestreo de agua empozada en el departamento de Piura, distrito de Catacaos-Narihualá

Fig. 25. Muestreo de agua de cultivo de arroz en el departamento de Piura, distrito de Sullana-Marcavelica.

Fig. 26. Muestreo de agua empozada en la ciudad de Piura, distrito de Sullana-Marcavelica

Fig. 27. Muestreo de agua empozada en la ciudad de Piura, distrito de Querocotillo.

Fig. 28. Huevo de *Aedes aegypti*. Se observa la forma ovalada la coloracion negra. Material biológico proporcionado por el INS.

Fig. 29. Huevo de *Aedes aegypti*. Se observa una larva del primer estadio saliendo del huevo. Material biológico proporcionado por el INS.

Fig. 30. Larva del tercer estadio de *Aedes aegypti*. Se observa la esclerotizacion del sifón hasta un poco mas de la mitad y la hilera de dientes presente en el octavo segmento. Estadío utillizado para los bioensayos. Foto tomada del material biológico proporcionado por el INS.

Fig. 31. Bioensayo

Fig. 32. Evaluación de la mortalidad larvaria después de 24 horas de bioensayo.

RESUMEN

Aedes aegypti es un vector de enfermedades de importancia en salud pública que es controlado con insecticidas químicos, sin embargo la naturaleza de estos insecticidas generan daños al ambiente y al hombre, además de generar resistencia entre las poblaciones de mosquitos. El objetivo de la presente investigación fue aislar y caracterizar cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad larvica frente a *Aedes aegypti* que puedan ser utilizadas como controladores biológicos de éste mosquito vector, y ser una alternativa más ecológica frente al uso de los insecticidas químicos. Las cepas fueron aisladas de 3 ecorregiones costeras del Perú, las que fueron caracterizadas a través de pruebas bioquímicas diferenciales, observación de cristales parasporales y caracterizadas molecularmente a través de la detección de genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa*. La actividad larvica de las cepas nativas fue determinada siguiendo la metodología descrita por la OMS (2005), y utilizando la cepa *B. thuringiensis* HD-500 como patrón.

De las ecorregiones de Piura, Chiclayo y Lima se aislaron 9 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, de las cuales 3 mostraron alta toxicidad para larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*. Estas cepas mostraron cristales parasporales circulares, pruebas bioquímicas características de *Bacillus thuringiensis* y la posesión genes *cry11Aa* y *cyt1Aa* para 2 de las cepas nativas y la presencia de todos los genes evaluados para 1 cepa nativa.

Palabras clave: actividad larvica, aislamiento, caracterización, cepas nativas, genes *cry* y *cyt*, *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Aedes aegypti is a vector of diseases of importance in public health that is controlled with chemical insecticides, however, the nature of these insecticides in the environment and man, in addition to the resistance in mosquitoes. The objective of the present investigation was to isolate and characterize native strains of *Bacillus thuringiensis* with larvicidal activity against *Aedes aegypti* that become the biological vector of this mosquito, and a more ecological alternative to the use of insecticides and chemical products. The strains were isolated from 3 coastal ecoregions of Peru, which were characterized through differential biochemical tests, observation of parasporal crystals and characterized molecularly through the detection of genes *cry4Aa*, *cry11Aa* and *cyt1Aa*. The larvicidal activity of the native strains was determined according to the methodology described by the WHO (2005), and uses the strain *B. thuringiensis* HD-500 as a standard.

From the ecoregions of Piura, Chiclayo and Lima, 9 native strains of *Bacillus thuringiensis* were isolated, of which 3 the high toxicity for the larvae of the third stage of *Aedes aegypti*. These strains are classified into circular parasporal crystals, characteristic biochemical tests of *Bacillus thuringiensis* and possession of genes *cry11Aa* and *cyt1Aa* for 2 of the native strains and the presence of all genes evaluated for 1 native strain.

Keywords: larvicidal activity, isolation, characterization, native strains, *cry* and *cyt* genes, *Aedes aegypti*.

1. INTRODUCCIÓN

En América y el Perú, *Aedes (Stegomyia) aegypti* es el vector más importante en la transmisión del Dengue, una enfermedad vírica infecciosa que ha causado 2 380 000 casos registrados para América en el 2016 (OMS, 2018) y 6 362 casos en el Perú al 2017 (Guzmán, 2017). Además, éste vector puede transmitir otras enfermedades metaxénicas como el Zika y la Chikungunya, aunado al hecho que las vacunas no están disponibles, por lo cual estas enfermedades representan un serio problema de salud pública. El método más común para controlar estas enfermedades se basa en el control químico del vector. Entre los larvicidas usados en el Perú se destaca Themephos, compuesto organofosforado que ya ha generado resistencia entre las poblaciones de *Aedes*, en países como Cuba (Rodríguez et al., 2004), Argentina, Paraguay (Coronel et al., 2016), El Salvador (Bisset et al., 2009) y México (Gonzáles, 2013). También, en el Perú se han detectado casos de resistencia para piretroides en Tumbes y Puerto Maldonado (Cabezas, 2015), y para la deltametrina en Loreto (Bisset, 2007).

En respuesta al problema de resistencia, la baja especificidad y a los impactos negativos tanto para el ambiente como para el hombre ocasionado por los insecticidas químicos, se ha explorado la actividad entomocida de *Bti* la cual es eficaz para disminuir la densidad de larvaria de *Aedes aegypti* por lo que ha sido utilizado desde hace décadas para la producción de formulaciones de biolarvicidas basados en sus toxinas con alta especificidad contra larvas *Aedes aegypti* (Boyce et al., 2013). Su aplicación es segura para el ambiente, así como inocuo para

organismos no blanco incluido el hombre (Mittal, 2003; OMS, 1999). Bactivec, un biolarvicida producido en Cuba, Mexico y Brasil, contiene esporas y proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis israelensis* como agente activo, el cual es efectivo para el control de larvas, y que se ha demostrado, no es patogénico en ratas y conejos, por las vías oral y dérmica, respectivamente (Macebo, 2003).

El componente importante para la actividad larvicida del *Bacillus thuringiensis* es la presencia de inclusiones proteicas conocidas como cristales proteicos Cry y Cyt (González et al., 2011). La amplia diversidad de proteínas insecticidas (Cry y Cyt) producidas por esta bacteria sugiere que *Bacillus thuringiensis* es una fuente rica de proteínas con actividades entomocidas y contra otros organismos blanco (Palma et al., 2014). Dada su diversidad proteica, se formula la interrogante sobre la existencia de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* que presenten alta toxicidad para el vector *Aedes aegypti* en ecorregiones costeras del Perú.

En la presente investigación se aisló y caracterizó por métodos fenotípicos y moleculares cepas nativas de *Bt* que tienen actividad larvicida para *Aedes aegypti*, con el fin de buscar otras alternativas de control biológico frente a la resistencia que el vector ha ido adquiriendo por el uso indiscriminado de insecticidas químicos.

2. MARCO TEÓRICO

Historia de *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria entomopatogénica aislada por primera vez en 1902 por el científico japonés Ishiwata, a partir de larvas de *Bombyx mori* L. que presentaban “la enfermedad del gusano de la seda”, y a la cual nombró por primera vez como *Bacillus sotto*. (Richard, 1994)

Posteriormente, en 1915, Berliner aísla a partir de larvas enfermas de *Ephestia cautella* “la polilla de la harina”, una bacteria entomopatógena a la cual describe y nombra como *Bacillus thuringiensis*, en alusión a la provincia de Turingia en Alemania, el lugar de la cual fue aislada. (Berliner, 1915)

La descripción de Ishiwata fue muy incompleta, es por ello que la descripción y el nombre de Berliner (1915), finalmente se aceptaron como el original. (Richard, 1994)

Hasta el año 1956, aún no se conocía el papel ni tampoco la estructura del cristal (Richard, 1994) sin embargo, por aquél año, Angus demuestra que el principio tóxico en cultivos esporulados de *Bacillus sotto* (*Bacillus thuringiensis*) eran las inclusiones cristalinas y que además tenían la propiedad de ser insolubles en agua y solubles en zumo de intestino de gusano de seda o en soluciones alcalinas diluidas. (Angus, 1956)

Finalmente, en 1977, Goldberg y Margalit logran aislar la cepa “60A” de *Bt* var. *israelensis* de los suelos de Israel, la cual demostró buena actividad contra especies de 4 géneros (*Anopheles sergentii* (Theo.), *Uranotaenia unguiculata* Edw., *Culex univittatus* Theo., *C. pipiens* L. y *Aedes aegypti* (L.)), además de esto, hallaron que el cristal era resistente a 60 °C por 20 minutos y a la luz ultravioleta.

Características de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que usualmente es móvil y mide entre 1.0-1.2 μm de ancho por 3.0-5.0 μm de largo. Se reproducen individualmente, en pares y cadenas, y forman esporas laterales elipsoidales que no deforman los esporangios (Berliner, 1915; De Vos et al., 1984).

Fenotípicamente, *Bacillus thuringiensis* es similar a otras especies como *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoides*, especialmente con la especie *Bacillus cereus* dado que no existen suficientes diferencias en sus características culturales y bioquímicas para lograr distinguirlas (Sauka y Benintende, 2008) a pesar de esto, el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa indica la individualidad de *Bacillus thuringiensis* en base a sus propiedades insecticidas y la presencia de cristales parasporales.

Las proteínas insecticidas Cry y Cyt, también conocidos como δ -endotoxinas, son de naturaleza proteica y son los que le atribuyen a la bacteria las propiedades insecticidas (Angus, 1956). Se han encontrado δ -endotoxinas tóxicas contra insectos de los órdenes Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Himenópteros, Homópteros, Orthópteros, y Mallophaga y contra nemátodos, ácaros y protozoos (Schnepf et al., 1998).



Fig. 1. Espora y cristal parasporal entomocida de *B. thuringiensis*. (A) Célula completamente esporulada que contiene la espora no deformante (Sp) y el cristal (Cr). Foto tomada de Bulla, 1977.

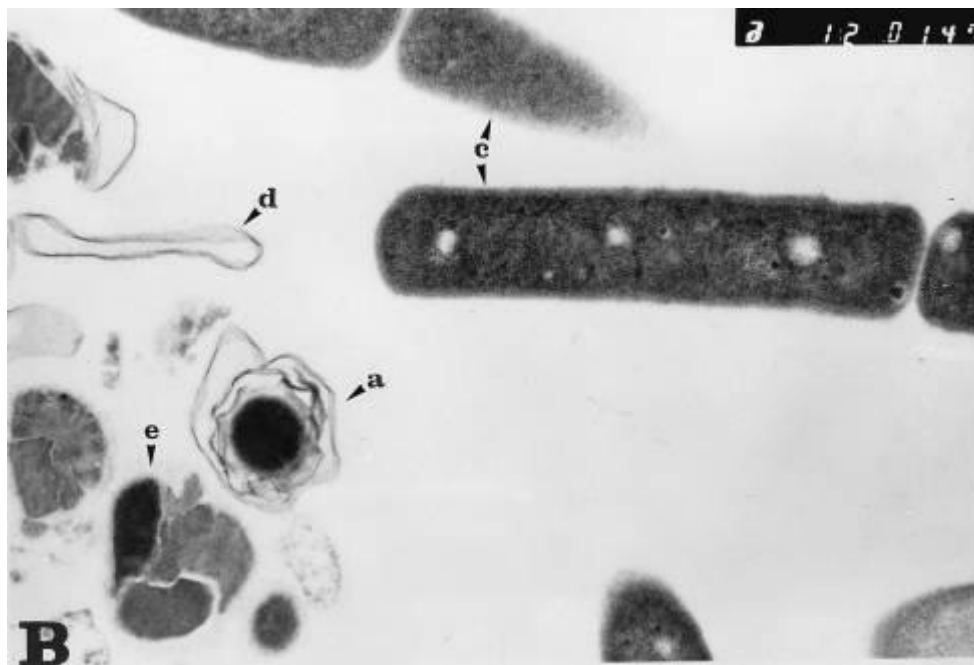


Fig. 2. Microfotografía electrónica de *Bacillus thuringiensis* después de 11 horas de incubación. a, espora libre; c, forma vegetativa de la bacteria distribuida en cadenas; e, cristal proteico libre. Magnificación, 22,500X (B). Imagen tomada de Manasherob et al. (1998).

Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*

Bulla et al. (1980) describió que el ciclo de vida de *Bt* se caracteriza por dos fases que incluyen la división celular vegetativa y el desarrollo de esporas, también conocido como ciclo de esporulación. La célula vegetativa tiene forma de bastón y se divide en dos células hijas uniformes por la formación de un tabique de división iniciado en la mitad de la membrana plasmática.

Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *Bt*

Su acción se produce por ingestión de la protoxina. Una vez ingerido por los invertebrados blanco, los cristales se solubilizan en monómeros y se activan proteolíticamente en el lumen intestinal de invertebrados. Los monómeros de proteínas se unen a los receptores de las células intestinales, luego se oligomerizan para formar poros. Sin embargo, existen dos modelos propuestos para el mecanismo de acción de *Bt*. El modelo clásico, ya mencionado, propone que el cristal de *Bt* causa un desequilibrio osmótico en respuesta a la formación de poros en una membrana celular (Soberon et al., 2010; Pardo-Lopez et al., 2009; Bravo et al., 2007). El segundo modelo determina que *Bt* causa la apertura de canales iónicos iniciando el proceso de muerte celular (Zhang et al., 2005). Los estudios realizados a la fecha parecen indicar que la proteína Cry puede causar tanto la formación de poros en las membranas como la activación de los canales iónicos (Melo et al., 2016).

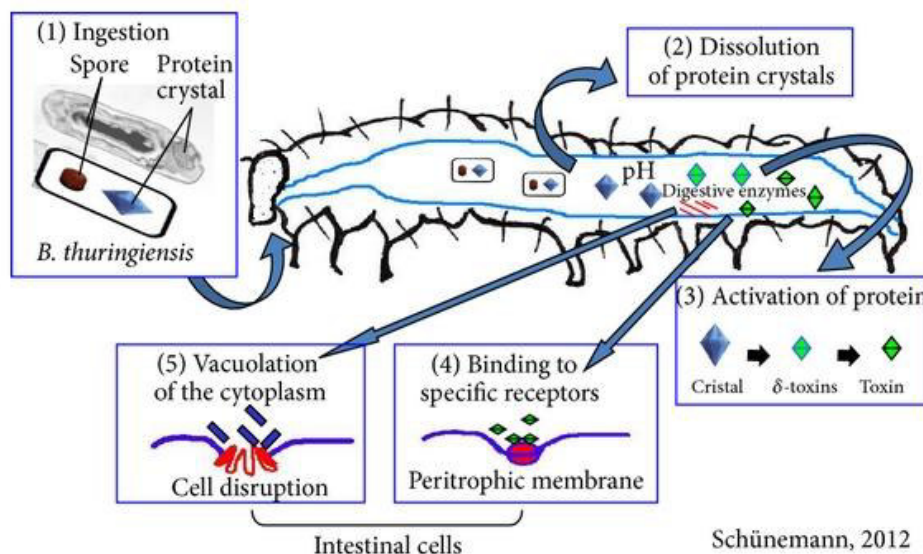


Fig. 3. Modo de acción de *Bacillus thuringiensis* en Lepidoptera: ingestión de la bacteria (1); solubilización de los cristales (2); activación de la proteína (3); unión de las proteínas a los receptores (4); formación del poro de membrana y lisis celular (5). Imagen tomada de Schünemann et. al (2014).

Caracterización molecular de Bt.

Las relaciones taxonómicas de las especies *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, aún no están claras y más aún las diferencias entre *B. thuringiensis* y *B. cereus* son mínimas dado que la única diferencia entre estas dos especies es la producción de la proteína insecticida por parte de *B. thuringiensis* (Galvis, 2013).

La aplicación de herramientas moleculares que hacen posible diferenciar cepas de *Bt* de una manera más apropiada es crucial para los estudios que buscan identificar nuevas cepas que puedan ser utilizadas en programas de control de plagas, sin embargo, los desafíos surgen a partir de la gran variabilidad encontrada en esta especie y la dificultad para correlacionar los patrones

moleculares detectados con la actividad insecticida en las cepas (Rabinovitch et al., 2017).

Entre las herramientas más utilizadas para la caracterización molecular de *Bacillus thuringiensis* se destacan: 16S rRNA, REP-PCR, ERIC PCR y MLST. Todas estas herramientas permiten identificar diferencias entre las cepas analizadas, pero sigue existiendo controversia sobre cuál de todas ellas es la más apropiada para ser utilizada como un método estándar para lograr caracterizar molecularmente las cepas de *B. thuringiensis* y poder correlacionar los patrones moleculares con la toxicidad hacia diferentes ordenes de insectos (Rabinovitch et al., 2017).

El gen RNAr 16S es considerado uno de los principales marcadores moleculares utilizado para estudiar la diversidad bacteriana, sin embargo su uso es restringido para el caso de las especies estrechamente relacionadas dado que éstas contienen alta similitud entre sus secuencias, caso que precisamente ocurre en el género *Bacillus* (Tenssay et al., 2009). Con el fin de superar estas limitaciones, algunos investigadores han utilizado el gen RNAr 16S combinado con el marcador ADN girasa (La Duc et al., 2004), pero aún así estas combinaciones no logran poder diferenciar entre *B. cereus* y *Bt*.

El análisis de las regiones repetitivas del genoma (PCR-REP y PCR-ERIC), basada en la amplificación por PCR, es una de las herramientas aplicadas con éxito para analizar la diversidad entre las especies de *Bacillus* ya que uso ha hecho posible la diferenciación entre las especies de *Bt* y *B. cereus*. La diversidad genética hallada en estas secuencias (REP y ERIC) hace posible su aplicación exitosa para estudiar la diversidad intra e interespecífica de las especies que

pertenecen al género *Bacillus*, además la eficiencia para diferenciar las especies es mayor que la encontrada en el gen para el ARNr 16S, la técnica es fácil y de rápida implementación y el hecho de que los resultados son confiables y reproducibles (Rabinovitch et al., 2017).

Actualmente, a pesar de todos los estudios realizados, la principal forma de diferenciar *B. cereus* de *Bt* es la posesión de toxinas activas contra ordenes de insectos dado que las investigaciones no pueden lograr una relación entre los patrones moleculares del ADN cromosómico y la actividad insecticida por lo que quizás la mejor manera de identificar y caracterizar nuevas cepas de *Bt* es analizando los genes de plásmidos responsables de brindar la información genética para la síntesis de éstas toxinas (Rabinovitch et al., 2017). Varios investigadores (Costa et al., 2010; Soares et al., 2015; Dos Santos et al., 2018) han utilizado la técnica PCR para identificar y caracterizar nuevas cepas de *Bt*. Ésta técnica es fácil y rápida, en la cual se usan cebadores diseñados específicamente para los genes *cry* conocidos, con el objetivo de predecir o identificar las proteínas producidas por las cepas analizadas.

Una cepa de *Bt* conocida como *Bacillus thuringiensis* subespecie *israeliensis* (Bti) se ha caracterizado como una cepa con alta actividad insecticida (LC₅₀ 10ng/ml), ésta produce tres toxinas Cry (Cry4A, Cry4B y Cry11A, Cry10A) y dos toxinas Cyt (Cyt1A y Cyt2A) a las cuales se le atribuye su toxicidad por la actividad larvicida que poseen individualmente y por las sinergias que existen entre ellas para lograr una cepa altamente toxica (Crickmore et al., 1995). Hasta ahora, se ha demostrado que la toxina Cyt1A sinergiza la actividad ya que actúa como un receptor unido a la membrana (Pérez et al., 2005). Dado que la toxicidad

de una cepa *Bacillus thuringiensis* depende de la presencia de diferentes tipos de genes funcionales *cry* que son los que codifican las proteínas Cry con propiedades entomocidas, la presencia de estos genes sirve para estimar la especificidad de una cepa bacteriana contra un grupo particular de insectos (Ben-Dov, 2014; Bravo et al., 2013; Frankenhuyzen, 2009).

Determinación de la toxicidad de cepas de *Bacillus thuringiensis*

La formulación final de cada producto de *Bt* se somete a ensayos biológicos contra un estándar internacional aceptado utilizando un insecto control. Actualmente, la actividad larvicida se expresa en términos de dosis letales (LD_{50}) o concentraciones letales (LC_{50} , LC_{90}), resultados que son suficientes para la comparación entre diferentes productos (OMS, 2005). Los productos basados en *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* se comparan con un polvo de referencia liofilizado de esta especie bacteriana, la cepa “ONR-60A” (HD-500, IPS 82, HD-563) reportada con alto nivel de toxicidad por Goldberg y Margalit (1977) y por ello es usada como cepa estándar.

Aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* de diferentes ecosistemas.

Bt es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. En el 2011, Gonzales et al., aislaron cepas de *Bacillus thuringiensis* que mostraron mayor actividad contra larvas de *Aedes aegypti* comparada con la cepa aislada del biolarvicida Bactivec (*Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* H-14), utilizada como referencia en su estudio.

Estos hallazgos han estimulado la identificación de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* con potencial entomocida altamente específicas en distintos países del mundo como en la India (Balakrishnan et al., 2015; Poopathi et al., 2014), en Malasia (Prazanna et al., 2011), en Etiopía (Tenssay et al., 2009), en Japón (Ishii y Ohba, 1993) y en China (Liang et al., 2011) obtenidas de ambientes naturales, que podrían ser utilizadas a futuro en la producción a gran escala (Mittal, 2003).

Flores et al. (2011), demostraron por primera vez en el Perú, el aislamiento y caracterización de *Bacillus thuringiensis* con actividad entomocida contra *Spodoptera frugiperda*, oruga que genera pérdidas agrícolas en suelos peruanos. Asimismo, en el estado de Amazonas en Brasil, Soares et al. (2015), hallaron cepas de *Bacillus thuringiensis* las cuales representan un potencial nuevo para el control del vector *Aedes aegypti*, por su actividad larvicida y la posibilidad de contener nuevas combinaciones de toxinas.

Huertas (2013) encontró 2 cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad entomocida contra larvas de *Aedes aegypti* provenientes de los departamentos de Ica y Cajamarca a partir de muestras de tierra, además, identificó que el gen *cry2* fue el más frecuente (92%), seguido de *cry1* (45%) y *cry4* (42%), con lo cual aseguró que las cepas tendrían principalmente, actividad entomocida contra dípteros.

Características generales del vector: *Aedes aegypti*

El nombre *Aedes aegypti*, como lo conocemos en la actualidad, fue originalmente descrita como *Culex aegypti* por Carl Linnaeus y su discípulo Fredrik Hasselquist

en 1762 (Christophers, 1960) y luego nombrada por Taylor como *Stegomyia fasciata* 1903 (Gómez, 2018). Más adelante, Mattingly et al. (1962) solicitaron a la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica la evaluación de su nombre que posteriormente concluyó en la denominación de la especie como *Aedes aegypti*.

El ciclo biológico de *Aedes aegypti* pasa por cuatro estadíos: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos, preferentemente son depositados en recipientes artificiales domiciliarios y peridomiciliarios, en condiciones ideales de temperatura, tipo y calidad de los depósitos de agua, la eclosión ocurre en un par de días. Los estadíos larvarios son 4 (L1, L2, L3 y L4) y se desarrollan en hábitats acuáticos. Después pasa a la fase acuática de pupa, en la cual la alimentación se detiene y posteriormente en dos a 3 días emerge el adulto, que es un mosquito volador y pequeño (Pérez, 2017).

Resistencia de larvas de *Aedes aegypti* a los insecticidas.

Aedes aegypti así como otros vectores, pueden desarrollar resistencia a los larvicidas cuando éstos son aplicados en forma intensiva para el control vectorial (Brogdon et al., 1998)

Durante las últimas décadas, el tratamiento focal utilizado para el control de larvas de *Aedes aegypti* se basó en el control químico. El insecticida más utilizado es el Temefos, insecticida organofosforado caracterizado por su actividad larvicida, baja toxicidad hacia mamíferos, de muy bajo costo y largo efecto residual (Coronel et al., 2016).

En el Perú, desde el año 2005, se ha detectado resistencia a los piretroides en las pruebas realizadas por el Instituto Nacional de Salud (INS) (Resistencia a permetrina en Tumbes y a Alfacipermetrina en Puerto Maldonado) (Cabezas, 2015). Así mismo, Bisset et al. (2007), demostraron diferentes niveles de resistencia a insecticidas piretroides y al organoclorado DDT en Tumbes y Trujillo.

En Lima- Perú, el Temefos ha sido usado como la única estrategia de control para larvas de *Aedes aegypti* (Palomino, 2006). Pérez (2017) evaluó la eficacia del Temefos frente al Pyriproxifeno a diferentes dosis (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 ppb) para el control de larvas de *Aedes aegypti* a nivel de laboratorio, encontrando que las poblaciones de mosquitos aún son susceptibles para el insecticida Temefos mientras que para el Piriproxifen ya han desarrollado resistencia, sin embargo un estudio realizado en Argentina demostró que entre los años 2006 - 2007, se habían detectado valores de resistencia incipiente a Temefos en larvas de *Aedes aegypti* colectadas en dicha ciudad (Pérez, 2017).

Por otro lado, en Cuba, el insecticida Temefos ha sido el larvicida más utilizado por el Programa de Control de *Aedes aegypti* y es precisamente en dicho país que Rodríguez et al. (2004), reportan el primer diagnóstico de alta resistencia a Temefos en Santiago de Cuba. En Paraguay reportaron un estado de alerta dado que se comprobó la resistencia al Temefos en dicho país (Coronel et al., 2016).

3. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

En los ecosistemas de la costa del Perú existen cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con potencial entomocida para controlar biológicamente al mosquito *Aedes aegypti*.

Objetivo general

Aislar y caracterizar fenotípica y molecularmente cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de tres ecoregiones de la costa peruana con alta actividad larvica contra *Aedes aegypti*

Objetivos específicos

1. Aislar cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de larvas muertas de *Aedes*, aguas estancadas y de tierra de las ecoregiones de Lima, Lambayeque-Chiclayo y Piura.
2. Seleccionar cualitativamente las cepas nativas de *Bt* que posean propiedades entomocidas para *Aedes aegypti* y determinar cuantitativamente la actividad larvica de las cepas nativas.
3. Identificar molecularmente los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa* en las cepas nativas seleccionadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

- Larvas *Aedes aegypti* del tercer estadio procedentes del INS

Cepas patrones

- *Bacillus thuringiensis* HD-500 NRRL (Northern Regional Research Laboratory) del Bacillus Genetic Stock Center proporcionado por el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología 223 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.
- *Bacillus thuringiensis* H14, cepa aislada del bioinsecticida comercial “Bactivec”

1. Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de larvas muertas, agua y suelo.

1.1 Elección de las zonas de muestreo.

Para definir los puntos de muestreo se consideraron las localidades donde se registraron brotes de Dengue en la costa central del Perú en los meses de Septiembre del 2017 y Marzo del 2018 y presencia de *Aedes aegypti*. Los puntos de colección fueron en distritos de las ecoregiones de Lima, Lambayeque y Piura, los cuales fueron georreferenciados (ver tabla 1) Las muestras de larvas muertas, agua y tierra fueron tomadas con ayuda de espátulas, pipetas y frascos estériles y transportadas en un cooler hasta que se procesaron para el

aislamiento. Se recolectaron 32 muestras de las cuales 2 eran muestras de agua de Lima

(Distrito de Chorrillos, Pantanos de Villa) y 6 eran muestras de agua de Lambayeque (Distrito Leonardo Ortiz). En la ecoregión Piura (Distrito de Catacaos, Sullana y Morropón) se tomaron muestras de agua, tierra y larvas muertas (Ver tabla 1). Ocho muestras fueron de agua, 6 fueron muestras de tierra y finalmente 2 fueron muestras de larvas muertas.

TABLA 1. COORDENADAS GEOGRAFICAS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO POR CADA DISTRITO

N° de muestra	DISTRITO	COORDENADAS
1	CATACAOS-PIURA	S 5° 17' 34.5" O 80°41'15.11"
2	CATACAOS-PIURA	S 5° 17' 44.24" O 80°41'09.29"
3	CATACAOS-PIURA	S 5° 17' 47.53" O 80°41'07.73"
4	CATACAOS-PIURA	S 5° 17' 47.72" O 80°41'06.00"
5	CATACAOS-PIURA	S 5° 18' 05.75" O 80°41'02.84"
6	CATACAOS-PIURA	S 5° 18' 05.66" O 80°41'02.84"
7	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.72" O 80°42'28.86"
8	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.53" O 80°42'28.99"
9	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.49" O 80°42'28.08"
10	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.85" O 80°42'28.08"
11	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.59" O 80°42'27.23"
12	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.72" O 80°42'28.59"
13	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 24.09" O 80°42'35.03"
14	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 23.99" O 80°42'35.06"
15	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 24.45" O 80°42'38.37"
16	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.53" O 80°42'39.31"
17	SULLANA-PIURA	S 4° 51' 23.08" O 80°41'07.39"
18	SULLANA-PIURA	S 4° 52' 22.53" O 80°42'39.31"
19	SULLANA-PIURA	S 4° 50' 29.99" O 80°38'03.29"
20	SULLANA-PIURA	S 4° 50' 19.61" O 80°38'22.78"
21	SULLANA-PIURA	S 4° 51' 23.08" O 80°41'07.39"
22	MORROPON-PIURA	S 4° 50' 29.27" O 80°01'22.66"
23	MORROPON-PIURA	S 4° 50' 29.27" O 80°01'22.66"
24	MORROPON-PIURA	S 4° 50' 29.33" O 80°01'22.33"
25	LEONARDO ORTIZ- CHICLAYO, LAMBAYEQUE	S 6° 45' 21.028" O 79° 50' 31.649"
26	LEONARDO ORTIZ- CHICLAYO; LAMBAYEQUE	S 6° 45' 19.159" O 79° 50' 31.459"
27	LEONARDO ORTIZ- CHICLAYO, LAMBAYEQUE	S 6° 46' 38.042" O 79° 52' 8.436"
28	LEONARDO ORTIZ- CHICLAYO, LAMBAYEQUE	S 6° 45' 26.957" O 79° 49' 38.366"
29	LEONARDO ORTIZ- CHICLAYO, LAMBAYEQUE	S 6° 44' 33.994" O 79° 50' 56.972"
30	LEONARDO ORTIZ- CHICLAYO, LAMBAYEQUE	S 6° 45' 41.71" O 79° 50' 25.908"
31	CHORILLOS- LIMA	S 12° 12' 42.865" O 76° 59' 21.339"
32	CHORILLOS- LIMA	S 12° 13' 21.76" O 76° 58' 41.62"

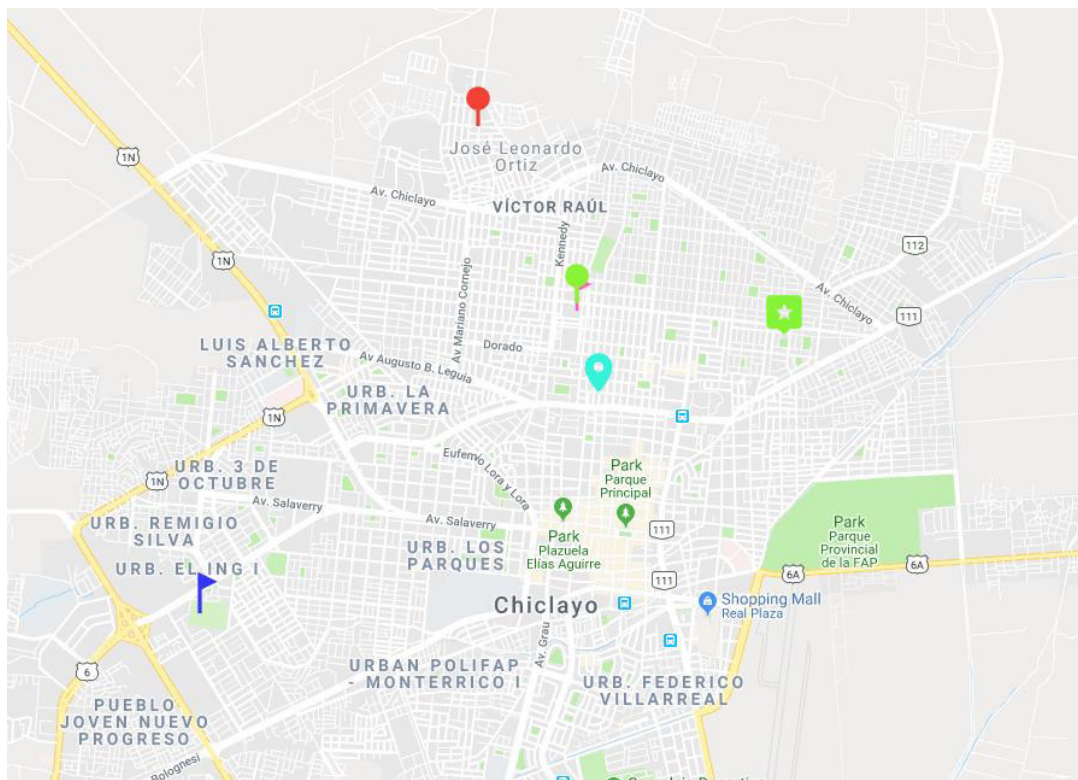


Fig. 4. Puntos de muestreo en el distrito Leonardo Ortiz- Chiclayo, Lambayeque

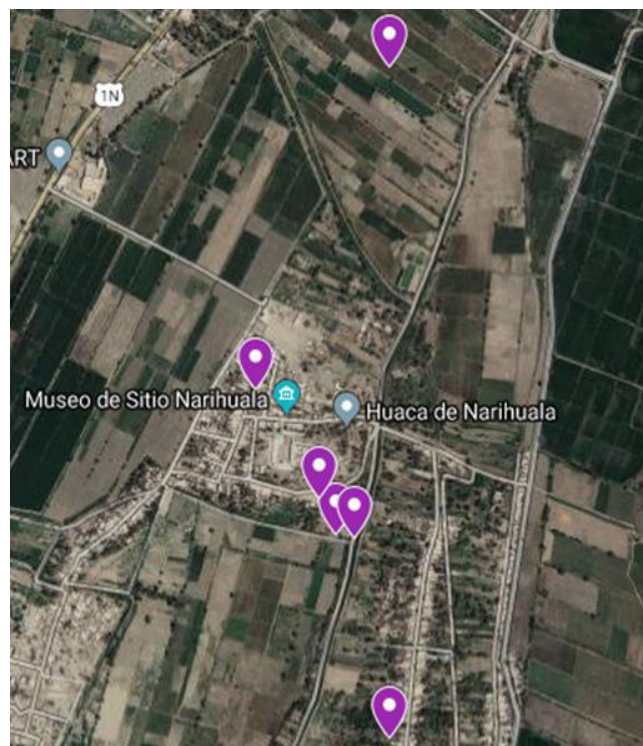


Fig. 5. Puntos de muestreo en el distrito Catacaos, Narihualá. Piura.

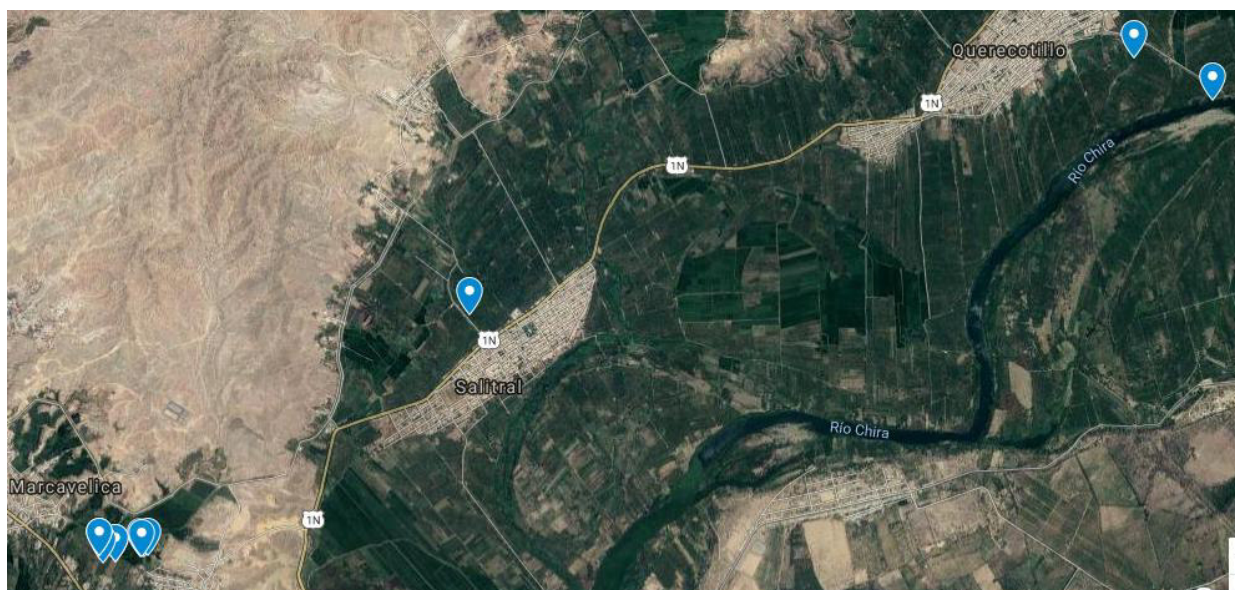


Fig. 6. Puntos de muestreo en el distrito Sullana, Piura.

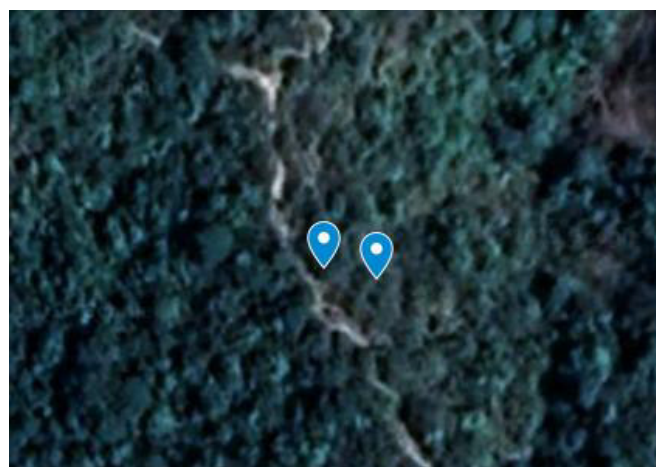


Fig. 7. Puntos de muestreo en el distrito Morropón, Piura.

1.2 Procesamiento de la muestra

Para el procesamiento de las muestras, se siguieron las recomendaciones propuestas por Travers (1987). Las muestras de agua y tierra fueron diluidas seriadamente hasta 10^{-4} en solución salina peptonada, posteriormente, las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se sometieron a shock térmico a 75-80°C por 15 minutos y enfriadas en hielo. Se sembraron en caldo acetato de sodio 0.25M a 30° por 18 horas y luego se sometieron a 70°C por 10 minutos, posteriormente los cultivos fueron sembrados en agar nutricio a 30°C por 24 horas. Para las muestras de larvas muertas, previamente las larvas se colocaron por 2 minutos en hipoclorito de sodio al 1%, posteriormente se lavaron con solución salina 2 veces y finalmente con ayuda de una pinza se presionaron las larvas hasta liberar todo el contenido intestinal. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} y se inoculó 0.1 ml de la dilución -6 y -7 en placas Agar Nutritivo, finalmente se dejó incubando a 30°C por 24 horas. También, a partir de estas diluciones se realizó un shock térmico y se siguió el procedimiento usado para las muestras de agua y tierra indicado anteriormente.

Después de la incubación, se seleccionaron aquellas cepas que presentaron las características típicas: colonias grandes circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro. Luego se realizó una coloración Gram seleccionando a las cepas Gram + y con presencia de esporas no deformantes. Estas cepas fueron repicadas en agar PEMBA y se seleccionaron aquellas de color turquesa con una zona de precipitación de la lecitina después de 48 horas de incubación.

Para distinguir *Bt* de *Bacillus cereus*, las colonias sospechosas se examinaron bajo el microscopio óptico para determinar la presencia de cristales parasporales

a partir colonias desarrolladas en agar PEMBA utilizando la tinción de Sharif, 1988 (azul de Comassie 0.25%, etanol 50% y ácido acético 7%) en microscopio óptico a 1000x complementándose con pruebas bioquímicas diferenciales como: Lecitinasa en Agar yema de huevo, movilidad, crecimiento en 5, 7 y 8% de NaCl, hidrólisis del almidón y prueba de la catalasa.

1.2.1 Prueba de movilidad.

La prueba de la movilidad se realizó sembrando por puntura en un tubo con medio SIM (Sulfuro, Indol, Motilidad) La prueba se consideró positiva si el microorganismo crecía más allá del área de puntura.

1.2.2 Prueba de crecimiento en 5, 7 y 8% de NaCl

El crecimiento en altas concentraciones de sal ha sido una característica para diferenciar de manera preliminar las especies de *B. subtilis*, *B. anthracis* y *B. cereus* de *B. thuringiensis* ya que *Bt* no crece en medios con NaCl a concentraciones superiores del 7% mientras que *B. subtilis*, *B. anthracis* y *B. cereus* sí. La tolerancia a la salinidad se evaluó cultivando los microorganismos en tubos de 5 ml con caldo (peptona de carne 8g/L y 1% de extracto de levadura) incubado a 30°C por 72 horas. Los medios contenían 5, 7 y 8 % de NaCl.

1.2.3. Hidrólisis del Almidón.

Se usaron placas Agar Almidón al 1%, las cuales fueron sembradas por puntura e incubadas por 48 horas a 30°C. Posteriormente se agregó 2ml de Lugol considerándose la prueba positiva si se observaban halos transparentes.

1.2.4. Prueba de la Catalasa

Las cepas fueron sembradas por estría en Agar Nutritivo por 24 horas a 30°C. Posteriormente se agrego una gota de Peroxido de Hidrógeno y se consideró positiva cuando se formaron burbujas de O₂ producto de la actividad enzimática.

1.2.5 Análisis de la morfología del cristal de *Bt*

Las cepas de *Bt* fueron sembradas en agar PEMBA y Agar Hi Crome (Medios de esporulación) por 48 horas a 30°C, posteriormente se fijaron y tiñeron con la coloración Azul de Sharif, 1988 (azul de Comassie 0.25%, etanol 50% y ácido acético 7%) por 3 minutos. Finalmente se observó en un microscopio óptico a 1000X la morfología de los cristales (circulares, bipiramidales, amorfos o en forma de gorro)

1.2.6 Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron en viales tapa rosca con 10 ml de medio Agar nutricio en plano inclinado. Los inóculos se incubaron por 24 horas a 30°C y posteriormente se guardaron a 4°C.

1.2.7 Índice de *Bacillus thuringiensis*

A partir de los aislamientos se halló el índice *Bt*, el cual indica el número de colonias *B. thuringiensis* identificadas con respecto al número de colonias examinadas y está considerado como una medida del éxito en el aislamiento de *B. thuringiensis*.

2. Selección cualitativa de las cepas nativas de *Bt* que posean propiedades entomocidas para *Aedes aegypti* y determinación cuantitativa de la actividad larvica de las cepas nativas

2.1 Crianza de *Aedes aegypti* para el bioensayo cualitativo.

La crianza y propagación larvas *Aedes aegypti* fueron hechas en el insectario del INS (Instituto Nacional de Salud). Para la eclosión, los huevos de *Aedes aegypti*, donados por el INS, fueron colocados en bandejas con agua declorada (agua almacenada por 48 a 72 horas), adicionalmente se agregó 1/8 de pastilla de suplemento de levadura (marca Mason) para la alimentación de las larvas L1 hasta alcanzar el estadio L3 y estadio L4 temprano utilizando las características descritas por Harrison y Rattanarithiku (1973), para la identificación del estadio. Los mosquitos de *Aedes aegypti* hembra adultos fueron alimentados con sangre de ratón y se colocaron ovitrampas para la puesta de los huevos.

2.2 Preparación del complejo espora-cristal para el bioensayo cualitativo de las cepas nativas

Las cepas se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) pH 7 a 28°C en agitación a 300 rpm hasta que el cultivo alcanzó el 90% de esporulación, corroborándose con la observación en el microscopio óptico 1000X utilizando la coloración Azul de Coomasie. A partir de los cultivos se centrifugó y elaboró una concentración madre de 5mg/ml de biomasa húmeda (complejo espora-cristal).

2.3 Bioensayo cualitativo de las cepas nativas.

La selección cualitativa de las cepas se realizó en vasos de plástico que contenían 100 ml de agua destilada estéril y 25 larvas L3 por cuadruplicado. Posteriormente se colocó 1 ml de la concentración madre (5mg de biomasa húmeda/ml) del cultivo de cada cepa a cada vaso y para contrastar la evaluación se utilizó como cepa control positivo la cepa de referencia *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* HD-500 proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología (Facultad de Ciencias Biológicas- UNMSM) y otra cepa de referencia aislada del Bioinsecticida “Bactivec” *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* H-14. Como control negativo se inoculó solo 1ml de Solución Salina. Después de 24 horas se realizó el conteo de larvas muertas y se seleccionaron aquellas cepas que mostraron una toxicidad del 100%. Después del bioensayo, se procedió a congelar las larvas que sobrevivieron.

2.4 Evaluación cuantitativa de la actividad larvica; Bioensayos

2.4.1 Determinación de la Concentración Letal Media (LC₅₀) de las cepas nativas aisladas.

2.4.1.1 Preparación del complejo espora-cristal:

Las cepas seleccionadas fueron sembradas en 300 ml de caldo LB pH 7 a 28°C hasta alcanzar el 90% de esporulación. Se centrifugaron a 7500 RPM por 35 min a 4°C y se lavó con solución salina 3 veces. Posteriormente se colocó 1 ml de biomasa en viales y se liofilizó por 8 horas.

2.4.1.2 Bioensayo para determinar LC₅₀.

Se utilizó el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2005) para determinar la LC₅₀ de las cepas seleccionadas. Para ello se preparó una suspensión madre de 0.01g/ml o 1% a partir del complejo espora-cristal liofilizado. Se realizaron diluciones seriadas de 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001 % y se añadió 400 ul, 300 ul, 200ul, 100ul, 80ul y 50 ul de cada concentración a cada vaso por cuadruplicado. Estas concentraciones fueron añadidas a vasos de plástico con 100 ml de agua destilada y 25 larvas del tercer estadio y como control negativo, uno de los vasos no tuvo la suspensión. Así mismo, como controles positivos se usó la cepa *B. thuringiensis* HD-500.

2.4.1.3 Análisis estadístico

Para la elaboración de la base y el procesamiento de datos, se utilizó el programa estadístico SPSS Estatistics versión 25. Para el cálculo de la letalidad se utilizó el modelo Probit con un nivel de confianza del 95%.

3. Identificación molecular de los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa*.

3.1 Extracción de ADN de *Bt*.

La extracción de ADN de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* se realizó según el protocolo del Anexo I. La integridad del ADN extraído se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE X (Tris 89 mM, Ácido acético, EDTA 2 mM; pH 8) a 120V por 20 min.

3.2 Cuantificación de ADN

El ADN obtenido fue cuantificado usando el espectrofotómetro NANODROP, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm para estimar su concentración y pureza respectivamente. A partir de los valores obtenidos se preparó diluciones a 50 ng/μL de ADN.

3.3 Amplificación de los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa*.

Como parte de la caracterización molecular, se identificaron los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa* implicados en la actividad larvica para *Aedes aegypti*. La presencia de los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa* fueron detectados por la técnica PCR a partir del DNA, utilizando los cebadores diseñados por Ben-Dov et al. (1997) y Costa et al. (2010) indicados en la Tabla 2. De las cepas con actividad larvica, se utilizó 50ng/ul del DNA de cada cepa y se añadió a una reacción final de 25ul conteniendo 1X de buffer de PCR, 3.0 mM MgCl, 0.4 mM dNTPs, 0.3 uM de cebadores, 0.02 U TaqPolimerasa (Merk) y agua de grado molecular. Las condiciones de amplificación fueron optimizadas a: temperatura de desnaturación inicial a 94°C por 30s, desnaturación a 94°C por 30 ciclos por 1 min, alineamiento en el rango de 50-59°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min y extensión final a 72°C por 7 min.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% a un voltaje de 70 V y posteriormente con bromuro de etidio por 20 min.

TABLA 2. CEBADORES USADOS EN LA REACCIÓN DE PCR PARA LOS GENES *cry* Y *cyt* DE *Bacillus thuringiensis*

Gen	Cebador	Tamaño (Pb)	Ta
<i>cry4Aa</i>^a	5'-GGGTATGGCACTCAACCCCACTT 3'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	1,529	59
<i>cry11Aa</i>^a	5'-CCGAACCTACTATTGCGCCA 3'-CTCCCTGCTAGGATTCCGTC	445	59
<i>cyt1Aa</i>^a	5'-AACTCAAACGAATAACCAAG 3'-TGTTCTTTACTGCTGATAC	300	50

^aCebadores diseñados por Ben-Dov et al. (1997)

^bCebador diseñado por Costa et al. (2010)

5. RESULTADOS

1. Aislamiento de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de larvas muertas, aguas estancadas y rizósfera de cultivos agrícolas de Piura, Lambayeque y Lima

Del total de muestras procesadas (32), sólo 7 muestras fueron positivas para la presencia de *Bacillus thuringiensis*, representando el 22% (Ver Tabla 3 y Fig. 8). Estas muestras positivas proceden de cuerpos de agua de los distritos de Catacaos (2), Sullana (1), Leonardo Ortiz (2) y Chorrillos (Pantanos de Villa) (2).

De las muestras de agua, tierra y larvas muertas, el mayor porcentaje de *Bt* fue en muestras de agua con un 29% (Ver Fig. 9). También, de todas las muestras procesadas se logró aislar un total de 80 cepas de *Bacillus* sp., de las cuales solo 9 cepas correspondían a *Bacillus thuringiensis* con un porcentaje del 11.3% (Ver Fig. 10).

Para cada muestra individual de agua, tierra y larvas muertas, el índice de *Bt* (Ver tabla 4, 5, 6, 7, 8 y Fig.11), varió desde 0,0 hasta 0,4; lo cual indica que el éxito para aislar *Bt* en muchas muestras fue nulo (25) y en otras pocas fue medianamente bajo (7).

TABLA 3. PORCENTAJE DE MUESTRAS DE AGUA, TIERRA Y LARVAS MUERTAS QUE CONTIENEN *Bacillus thuringiensis*

Tipo de muestra	Numero de muestras analizadas	Muestras positivas para <i>Bacillus thuringiensis</i> cristalíferas	% de muestras con <i>Bacillus thuringiensis</i>
Agua	24	7	29 %
Tierra	6	0	0%
Larvas muertas	2	0	0%
Total	32	7	22%

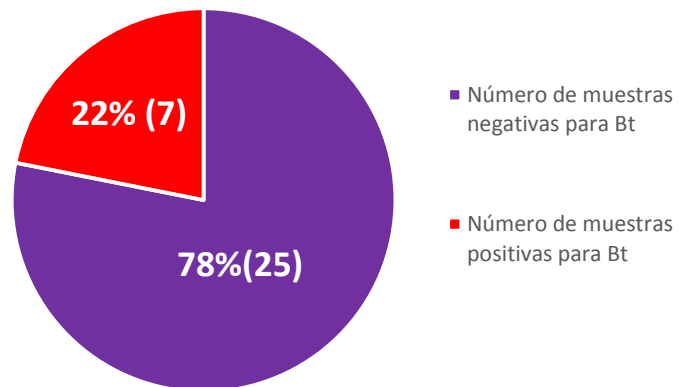


Fig. 8. Porcentaje de muestras que contienen *Bt*

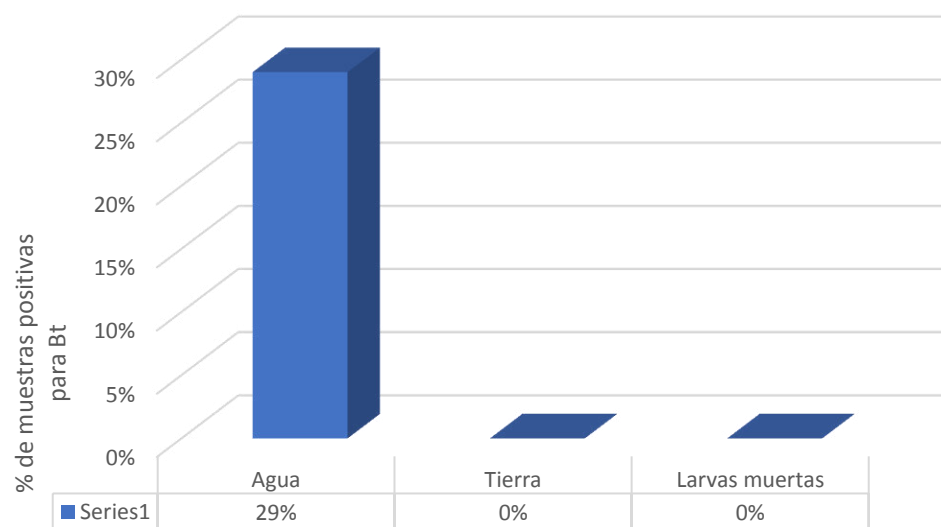


Fig. 9. Porcentaje de muestras de agua, tierra y larvas muertas que contienen *Bt*

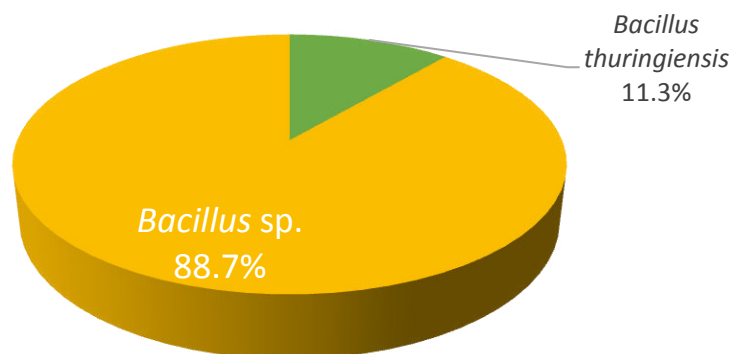


Fig. 10. Porcentaje *Bacillus thuringiensis* de las cepas de *Bacillus* sp. aisladas

TABLA 4. INDICE DE *Bacillus thuringiensis* POR MUESTRAS DE AGUA RECOLECTADAS EN EL DISTRITO DE CATACAOS-PIURA

N°	TIPO	COORDENADAS	N° de colonias de <i>Bacillus</i> sp presuntivas para <i>Bacillus thuringiensis</i> o <i>Bacillus cereus</i>	Colonias de <i>Bacillus thuringiensis</i> cristalíferas	Índice de Bt
1	AGUA+SEDIMENTO	S 5° 17' 34.5" O 80°41'15.11"	2	0	0,0
2	AGUA+ SEDIMENTO	S 5° 17' 44.24" O 80°41'09.29"	5	2	0,4
3	AGUA+ SEDIMENTO	S 5° 17' 47.53" O 80°41'07.73"	1	0	0,0
4	AGUA+SEDIMENTO	S 5° 17' 47.72" O 80°41'06.00"	2	0	0,0
5	AGUA+SEDIMENTO	S 5° 18' 05.75" O 80°41'02.84"	3	1	0,33
6	AGUA+SEDIMENTO	S 5° 18' 05.66" O 80°41'02.84"	1	0	0,0

TABLA 5. INDICE DE *Bacillus thuringiensis* EN MUESTRAS DE AGUA, LARVAS Y TIERRA RECOLECTADAS EN EL DISTRITO DE SULLANA-PIURA

N°	TIPO	COORDENADAS	N° de colonias de <i>Bacillus</i> sp. presuntivas para <i>Bacillus thuringiensis</i> o <i>Bacillus cereus</i>	Colonias de <i>Bacillus thuringiensis</i> cristalíferas	Indice de <i>Bt</i>
7	AGUA DE MACETERO CON LARVAS	S 4° 52' 22.72" O 80°42'28.86"	2	0	0,0
8	AGUA DE MACETERO CON LARVAS	S 4° 52' 22.53" O 80°42'28.99"	1	0	0,0
9	AGUA DE MACETERO	S 4° 52' 22.49" O 80°42'28.08"	2	0	0,0
10	AGUA DE MACETERO	S 4° 52' 22.85" O 80°42'28.08"	0	0	0,0
11	RIZOSFERA DE ARBOL	S 4° 52' 22.59" O 80°42'27.23"	2	0	0,0
12	AGUA DE MACETERO	S 4° 52' 22.72" O 80°42'28.59"	2	0	0,0
13	SUELO DE AGUA EMPOZADA	S 4° 52' 24.09" O 80°42'35.03"	0	0	0,0
14	AGUA EMPOZADA	S 4° 52' 23.99" O 80°42'35.06"	1	0	0,0
15	AGUA EMPOZADA	S 4° 52' 24.45" O 80°42'38.37"	2	0	0,0
16	AGUA DE CULTIVO DE ARROZ	S 4° 52' 22.53" O 80°42'39.31"	5	1	0,2
17	AGUA	S 4° 51' 23.08" O 80°41'07.39"	4	0	0,0
18	AGUA	S 4° 52' 22.53" O 80°42'39.31"	2	0	0,0
19	TIERRA DE CAMOTE Y BANANOS	S 4° 50' 29.99" O 80°38'03.29"	0	0	0,0
20	TIERRA DE PLATANO	S 4° 50' 19.61" O 80°38'22.78"	2	0	0,0
21	AGUA	S 4° 51' 23.08" O 80°41'07.39"	3	0	0,0

TABLA 6. INDICE DE *Bacillus thuringiensis* POR MUESTRA DE AGUA TOMADAS EN EL DISTRITO DE MORROPON-PIURA

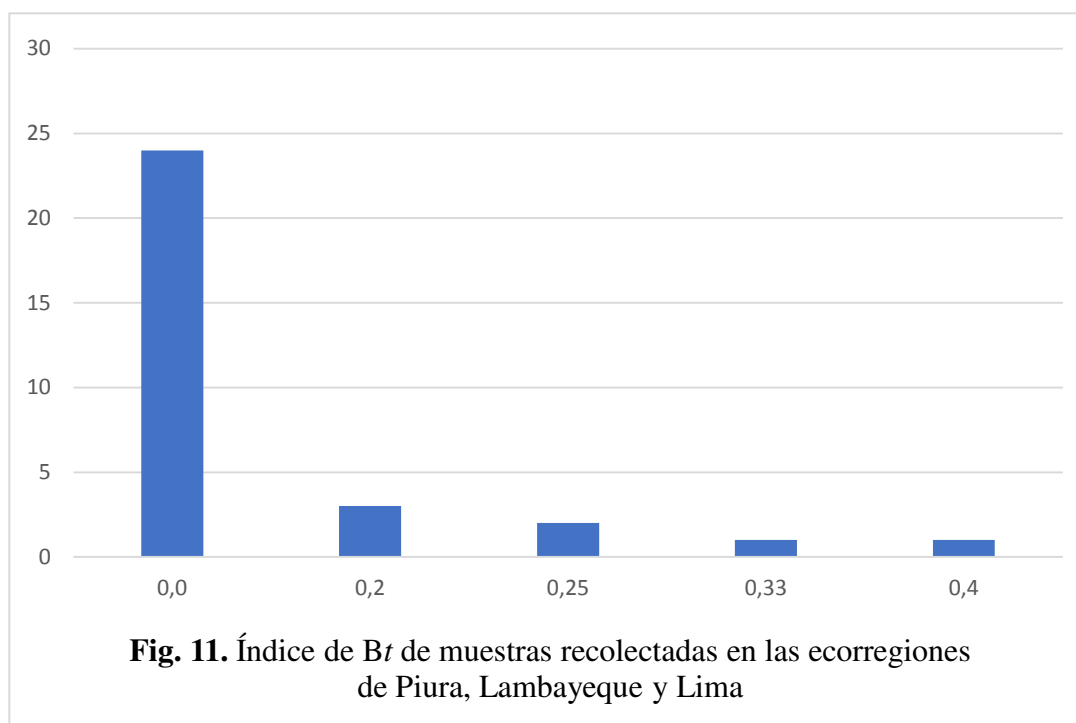
N°	TIPO	COORDENADAS	N° de colonias de <i>Bacillus</i> sp presuntivas para <i>Bacillus thuringiensis</i> o <i>Bacillus cereus</i>	Colonias de <i>Bacillus thuringiensis</i> cristalíferas	f de Bt
22	AGUA	4° 50' 29.27" 80°01'22.66"	2	0	0,0
23	AGUA	4° 50' 29.27" 80°01'22.66"	3	0	0,0
24	AGUA	4° 50' 29.33" 80°01'22.33"	4	0	0,0

TABLA 7. INDICE DE *Bacillus thuringiensis* POR MUESTRA DE AGUAS ESTANCADAS EN EL DISTRITO DE LEONARDO ORTIZ- CHICLAYO

N°	TIPO	UBICACIÓN (GEOREFERENCIA)	N° de colonias de <i>Bacillus</i> sp presuntivas para <i>Bacillus thuringiensis</i> o <i>Bacillus cereus</i>	Colonias de <i>Bacillus thuringiensis</i> cristalíferas	Indice de Bt
25	AGUA ESTANCADAS	S 6° 45' 21.028" O79° 50' 31.649"	4	1	0,25
26	AGUA ESTANCADAS DE PATIO DE COMIDAS DEL MERCADO	S6° 45' 19.159" O79° 50' 31.459"	0	0	0,0
27	AGUAS ESTANCADAS DEL CEMENTERIO	S6° 46' 38.042" O79° 52' 8.436"	2	0	0,0
28	AGUAS DEL CILINDRO DE POSTA MEDICA	S6° 45' 26.957" O79° 49' 38.366"	3	0	0,0
29	AGUA ESTANCADA DE VIVIENDA AL NORTE DE LA CIUDAD	S6° 44' 33.994" O79° 50' 56.972"	1	0	0,0
30	AGUA ESTANCADAS DE VIVIENDA AL SUR DE LA CIUDAD	S6° 45' 41.71" O79° 50' 25.908"	4	1	0,25

TABLA 8. INDICE DE *Bacillus thuringiensis* EN MUESTRAS DE AGUAS ESTANCADAS EN EL DISTRITO DE CHORILLOS- LIMA

N°	TIPO	UBICACIÓN (GEOREFERENCIA)	N° de colonias de <i>Bacillus</i> sp. presuntivas para <i>Bacillus thuringiensis</i> o <i>Bacillus cereus</i>	Colonias de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> cristalíferas	Indice de <i>Bt</i>
31	AGUA ESTANCADA DE PANTANOS DE VILLA	S 12° 12' 42.865" O 76° 59' 21.339"	5	1	0,2
32	AGUA ESTANCADA DE PANTANOS DE VILLA	S 12° 13' 21.76" O 76° 58' 41.62"	10	2	0,2



Caracterización fenotípica

Las colonias en Agar nutricio fueron aplanadas, de borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso y con diámetros desde 1.3 a 2.0 cm. En agar PEMBA, las colonias no fermentaban el manitol y tenían actividad lecitinasa. En agar Hi Crome todas las cepas fueron de centro color azul, aplanadas y de bordes irregulares. Los cristales parasporales mostraron 2 tipos de morfología: 5 cepas con cristales esféricos y 4 cepas con cristal circular pequeño con apariencia de gorro. Todas las cepas mostraron células vegetativas en forma de bacilos y esporas elipsoidales en posición terminal cuando fueron sembradas en los medios Agar PEMBA, Agar Nutricio y Agar HiCrome. En la prueba de Crecimiento a altas concentraciones de sales, las 9 cepas crecieron al 5% de NaCl mientras que ninguna creció al 7 y 8%. Para la prueba de hidrolisis del almidón, todas las cepas fueron positivas. Para la prueba de catalasa y motilidad todas las cepas fueron positivas para ambas pruebas. Todas estas características fenotípicas también coincidieron con las cepas patrones

TABLA 9. CARACTERÍSTICAS CULTURALES DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* EN AGAR NUTRICIO, AGAR PEMBA, AGAR HI CROME Y CALDO NUTRICIO

CEPA	AGAR NUTRICIO pH 7 Lectura: 24 horas	PEMBA pH 7 Lectura: 48 horas	AGAR HI CROME pH 7 Lectura: 48 horas	CALDO NUTRICIO pH 7 Lectura: 24 horas
<i>B. thuringiensis</i> CatNa2.A.1	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=17\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento blanco grisáceo
<i>B. thuringiensis</i> CatNa2.A.2	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=18\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento blanco grisáceo
<i>B. thuringiensis</i> CatNa5.A.1	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=18\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento blanco grisáceo
<i>B. thuringiensis</i> SulMa16A.1	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=19\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento blanco grisáceo
<i>B. thuringiensis</i> Chil.A	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=20\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento naranja marrón
<i>B. thuringiensis</i> ChiVI.B	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=17\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento naranja marrón tenue
<i>B. thuringiensis</i> LimVII.A	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=17\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento naranja marrón
<i>B. thuringiensis</i> LimVIII.A	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=17\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento blanco grisáceo
<i>B. thuringiensis</i> LimVIII.E	Colonia aplanada, borde irregular, color blanco grisáceo de aspecto farinoso $\phi=13\text{mm}$	Manitol (-) Lecitina (+)	Colonias de centro azul, aplanadas con bordes irregulares	Sedimento blanco grisáceo

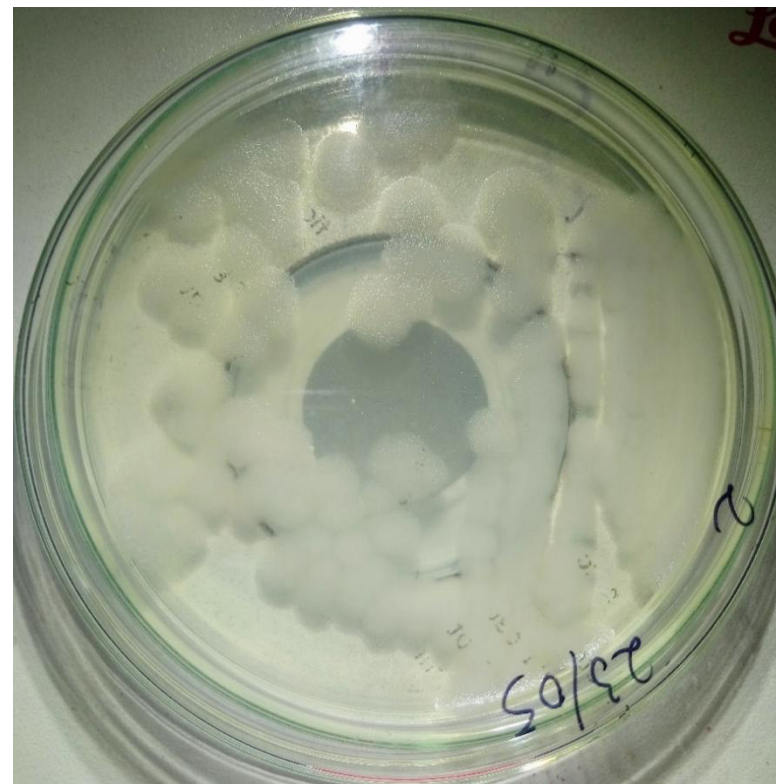


Fig. 12. Características culturales de la cepa *B. thuringiensis* Chil.A en Agar Nutritivo vista al estereoscopio. Lectura a las 24 horas. Se observan colonias aplanadas, de borde irregular, color blanco grisáceo y de aspecto farinoso.

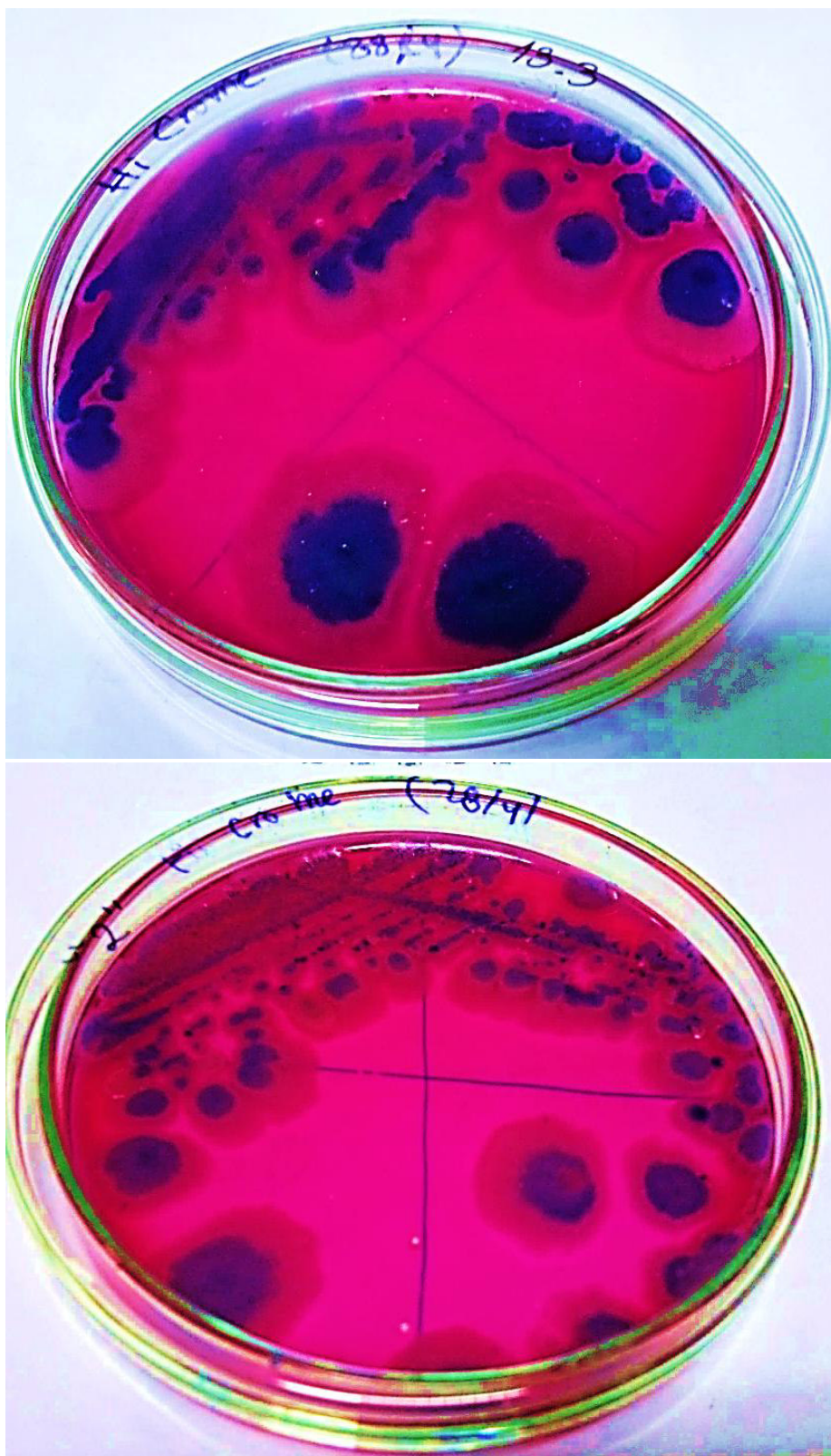


Fig. 13. Características culturales de la cepa *B. thuringiensis* ChiVI.B (Arriba) y la cepa *B. thuringiensis* Chil.A en agar Hicrome después de 48 horas de incubación. Se observan colonias aplanadas, de bordes irregulares, azuladas por la alcalinización del medio dado que las cepas no fermentan el manitol presente en el medio.

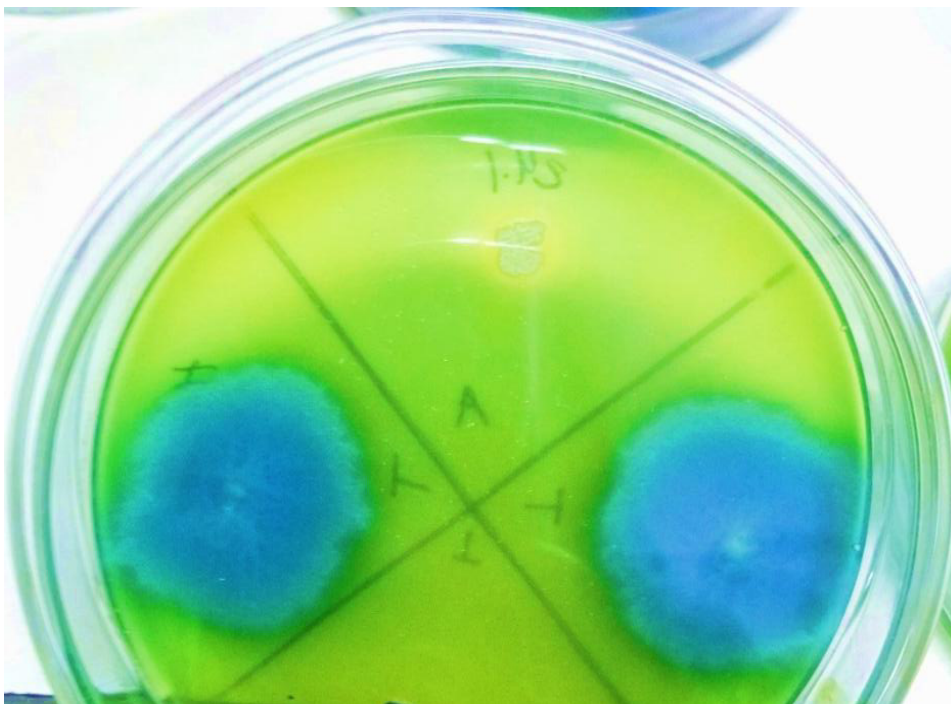


Fig. 14. Características culturales de las cepas nativas de *B. thuringiensis* en agar Pemba después de 48 horas de incubación. Se observan colonias aplanadas, de bordes irregulares, azuladas por la alcalinización del medio dado que las cepas no fermentan el manitol presente en el medio.

TABLA 10. PRESENCIA CRISTALES PARASPORALES DE CEPAS NATIVAS A PARTIR DE AGAR NUTRICIO, AGAR PEMBA Y AGAR HICROME POR LA COLORACION AZUL DE COMASIE

CEPA	AGAR NUTRICIO pH7 Lectura: 96 horas	AGAR PEMBA pH7 Lectura: 48 horas	AGAR HICROME pH7 Lectura: 48 horas
<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa2.A.1	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa2.A.2	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa5.A.1	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> SulMa16A.1	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> Chil.A	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> ChiVI.B	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVII.A	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.A	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.E	+	+	+

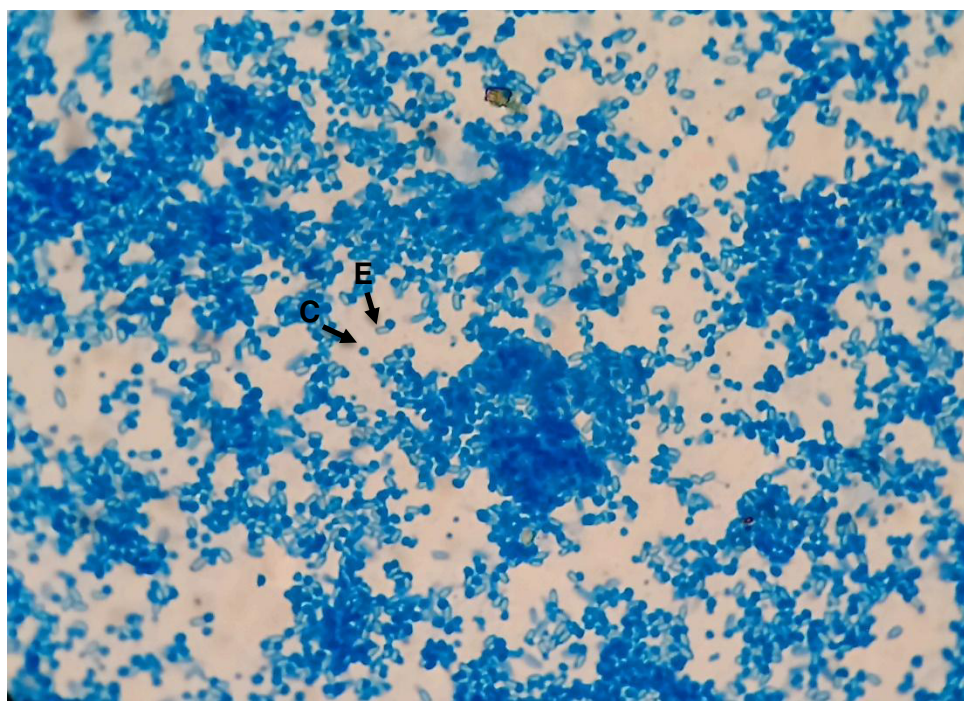


Fig. 15. Coloración Azul de Comasie de la cepa *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E a partir de agar PEMBA a las 48 horas de incubación. Aumento 1000x. Se observan las esporas (E) y los cristales circulares libres (C).

TABLA 11. MORFOLOGIA DEL CRISTAL PARASPORAL DE LAS CEPAS NATIVAS A PARTIR DE AGAR NUTRICIO, AGAR PEMBA Y AGAR HICROME

CEPA	AGAR NUTRICIO Ph7 Lectura: 96 horas	AGAR PEMBA Ph7 Lectura: 48 horas	AGAR HI CROME Ph7 Lectura: 48 horas
<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa2.A.1	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro
<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa2.A.2	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro
<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa5.A.1	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro
<i>Bacillus thuringiensis</i> SulMa16A.1	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro	Cristal circular pequeño con apariencia de gorro
<i>Bacillus thuringiensis</i> Chil.A	Cristal esférico	Cristal esférico	Cristal esférico
<i>Bacillus thuringiensis</i> ChiVI.B	Cristal esférico	Cristal esférico	Cristal esférico
<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVII.A	Cristal esférico	Cristal esférico	Cristal esférico
<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.A	Cristal esférico	Cristal esférico	Cristal esférico
<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.E	Cristal esférico	Cristal esférico	Cristal esférico

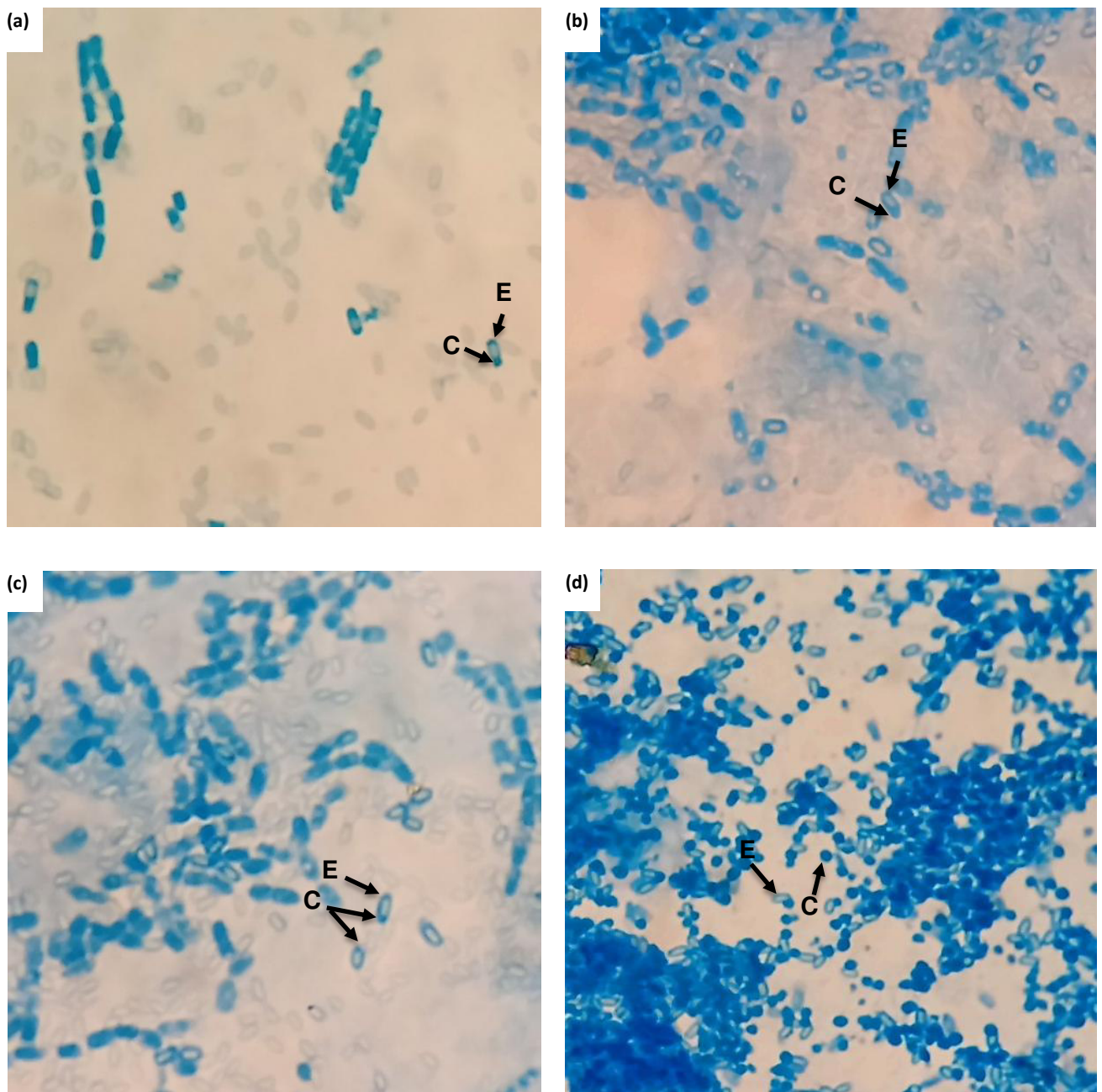


Fig. 16. Observación de la morfología de los cristales parasporales en microscopio óptico, aumento 1000x de cultivos esporulados de *Bacillus thuringiensis* aislados de muestras de agua y tierra del Perú. Las flechas negras indican la ubicación de la espora (E) y los cristales parasporales (C). Las cepas provenientes de Piura (a) SulMa16A.1, (b) CatNa5A.1 y (c) CatNa2.A.2 producen cristales circulares pequeños con apariencia de gorro los cuales no presentan actividad toxica para *Aedes aegypti*. Las cepas provenientes de Chiclayo y Lima (d) producen cristales circulares que si presentan actividad tóxica para larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*.

TABLA 12. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DIFERENCIALES DE LAS CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*

CEPA	Crecimiento en medios con alta salinidad			Hidrólisis del almidón	Prueba de la catalasa	Prueba de Lecitinasa	Manitol	Motilidad
	NaCl 5% Lectura: 72 horas	NaCl 7% Lectura: 72 horas	NaCl 8% Lectura: 72 horas	Agar almidón 1% Lectura: 72 horas				SIM Lectura: 48 horas
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>CatNa2.A.1</i>	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>CatNa2.A.2</i>	+	-	-	++	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>CatNa5.A.1</i>	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>SulMa16A.1</i>	+	-	-	++	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>ChiI.A</i>	+	-	-	+++	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>ChiVI.B</i>	+	-	-	++++	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>LimVII.A</i>	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>LimVIII.A</i>	+	-	-	++	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>LimVIII.E</i>	+	-	-	++	+	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>HD-500</i>	+	-	-	++	++	+	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>H-14</i>	+	-	-	+++	+	+	-	+

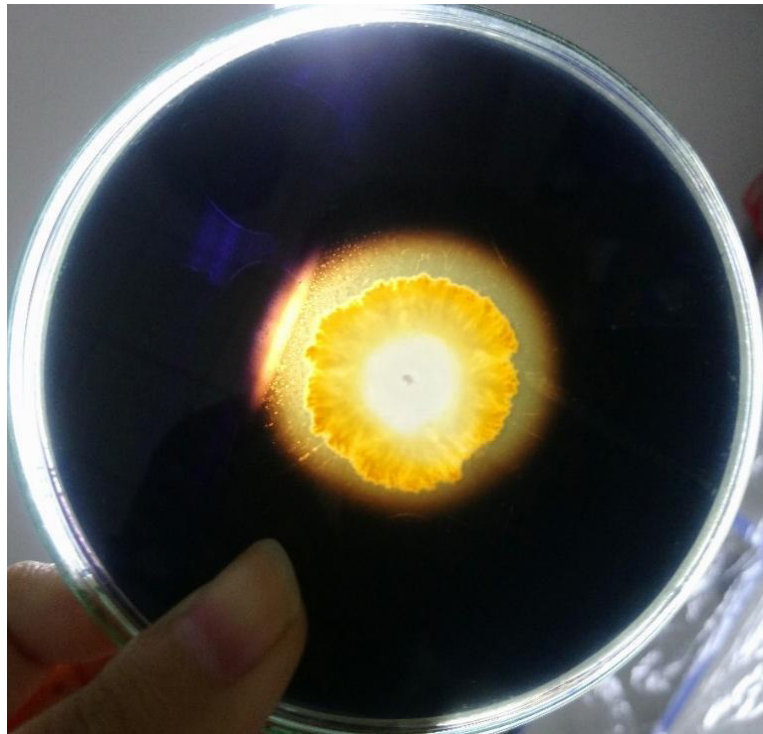


Fig. 17. Actividad amilasa de las cepas *Bacillus thuringiensis* ChiVIB (arriba) y *Bacillus thuringiensis* LimVIII E (abajo), lectura a la 48 horas.

2. Evaluación cualitativa de las propiedades entomocidas para *Aedes*

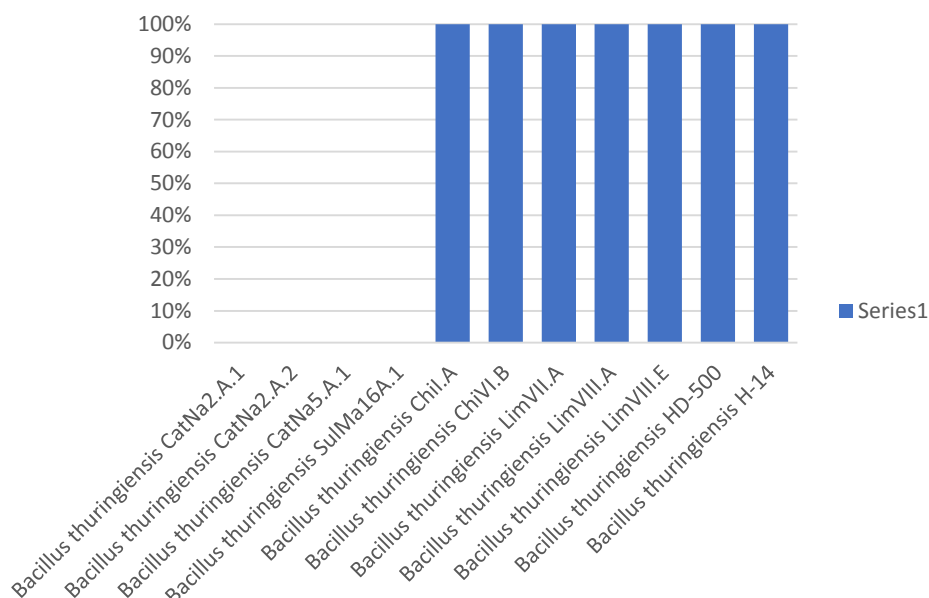
aegypti de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

El bioensayo cualitativo con larvas de *Aedes aegypti* mostraron que de las 9 cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas aisladas solo 5 cepas (55.5%): *Bacillus thuringiensis* Chil.A, *Bacillus thuringiensis* ChiVI.B, *Bacillus thuringiensis* LimVII.A, *Bacillus thuringiensis* LimVIII.A y *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E presentaron propiedades entomocidas para *Aedes aegypti*. Estas cepas provenían de las ecoregiones de Chiclayo y Lima, y tuvieron una mortalidad del 100%. Los resultados obtenidos podrían sugerir que las 5 cepas son de alta toxicidad, dado que todas las cepas mostraron una mortalidad del 100% a las 24 horas al igual que los estándares *Bacillus thuringiensis* HD-500 y *Bacillus thuringiensis* H-14 todas a una concentración de 5mg/ml de biomasa húmeda (complejo espora-cristal). (Ver Fig. 18)

TABLA 13. BIOENSAYO CUALITATIVO DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA LARVAS DEL TERCER ESTADIO DE *Aedes aegypti*

N°	CEPA	TRATADOS (cuadruplicado)	MUERTOS Lectura: 24 horas	MORTALIDAD (%)
1	<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa2.A.1	25	0	0
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa2.A.2	25	0	0
3	<i>Bacillus thuringiensis</i> CatNa5.A.1	25	0	0
4	<i>Bacillus thuringiensis</i> SulMa16A.1	25	0	0
5	<i>Bacillus thuringiensis</i> Chil.A	25	25	100
6	<i>Bacillus thuringiensis</i> ChiVI.B	25	25	100
7	<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVII.A	25	25	100
8	<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.A	25	25	100
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.E	25	25	100
10	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-500	25	25	100
11	<i>Bacillus thuringiensis</i> H-14	25	25	100

Fig. 18 Mortalidad de las cepas nativas de *Bt* contra *Aedes aegypti* para el ensayo cualitativo



2.1 Determinación del LC_{50} y LC_{95} .

Las concentraciones letales medias (LC_{50}) de las cepas *Bt* Chil.A, *Bt* ChiVI.B, *Bt* LimVII.A, *Bt* LimVIII.E y la cepa patrón HD-500 fueron 5.947, 4.556, 7.505, 632.789 y 7.535 ng/ml respectivamente y los valores de LC_{95} fueron 7.940, 5.196, 9.974, 789.964 y 9.430 ng/ml respectivamente (Ver Tabla 14). La cepa *Bt* ChiVI.B presentó una LC_{50} de 4.556 ng/ml lo que indica que es 1.6 veces más tóxica que la cepa patrón la cual presentó 7.535 ng/ml. Por otro lado la cepa *Bt* LimVII.A presentó valores similares a la cepa patrón. Estos valores indican que las cepas nativas encontradas necesitan concentraciones casi iguales o menores a la cepa patrón para lograr matar el 50% de la población larvaria, en otras palabras, las cepas son igual o más tóxicas que la cepa patrón HD-500. Lo indicado anteriormente no se cumple para la cepa *Bt* LimVIII.E ya que presentó un valor de 632.789 ng/ml, mucho más alto que la cepa patrón, esto indica que la cepa *Bt* LimVIII.E es menos tóxica.

TABLA 14. VALORES DE LC 50 Y LC90 DE LAS CEPAS NATIVAS Y LA CEPA PATRÓN CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADIO *Aedes aegypti*.

CEPA	CL ₅₀ (ng/ml)	CL ₉₅ (ng/ml)	Relación de Toxicidad ^a
<i>Bt Chil.A</i>	5.947 (4.395-4.679)	7.940 (6.644-13.032)	1.267
<i>Bt ChiVI.B</i>	4.556 (4.395-4.679)	5.196 (5.067-5.376)	1.65
<i>BT LimVII.A</i>	7.505 (4.071-8.364)	9.974 (9.172-12.793)	1.00
<i>Bt LimVIII.E</i>	632.789 (598.919-665.604)	789.964 (752.298-837.165)	0.012
<i>Patrón HD-500</i>	7.535 (6.290-7.944)	9.430 (9.018-10.685)	1.00

^a Las relaciones de toxicidad se calcularon con la LC 50 de las cepas nativas divididas por la LC 50 de la cepa patrón HD-500 .

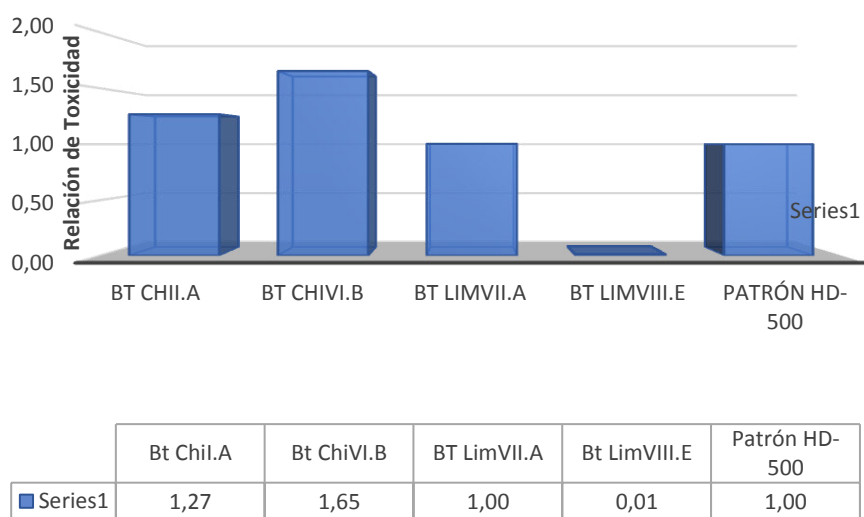


Fig. 19. Relación de toxicidad de las cepas nativas de *Bt* con la cepa patrón *Bt* HD-500

3.3 Identificación molecular de los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa*.

Como parte de la caracterización molecular, se identificaron los genes implicados en la actividad larvica para Dípteros: *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa* por la técnica de PCR. En la Fig. 20 se muestra la integridad del ADN extraído.

Para el caso del gen *cry4Aa*, las cepas *Bacillus thuringiensis* ChiVI.B, *Bacillus thuringiensis* LimVII.A, *Bacillus thuringiensis* LimVIII.A y *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E no amplificaron para este gen mientras que la cepa nativa *Bacillus thuringiensis* Chil.A y los patrones *Bacillus thuringiensis* HD-500 y *Bacillus thuringiensis* H-14 sí presentaban éste gen (Ver Tabla 15 y Fig. 21).

Para el gen *cry11Aa*, todas las cepas nativas *Bacillus thuringiensis* Chil.A, *Bacillus thuringiensis* ChiVI.B, *Bacillus thuringiensis* LimVII.A, *Bacillus thuringiensis* LimVIII.A y *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E amplificaron para este gen al igual que los patrones *Bacillus thuringiensis* HD-500 y *Bacillus thuringiensis* H-14 (Ver Fig. 22).

Finalmente, para el gen *cyt1Aa* todas las cepas nativas *Bacillus thuringiensis* Chil.A, *Bacillus thuringiensis* ChiVI.B, *Bacillus thuringiensis* LimVII.A, *Bacillus thuringiensis* LimVIII.A y *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E amplificaron para este gen al igual que los patrones *Bacillus thuringiensis* HD-500 y *Bacillus thuringiensis* H-14 por lo que sí presentaban este gen (Ver Fig. 23).

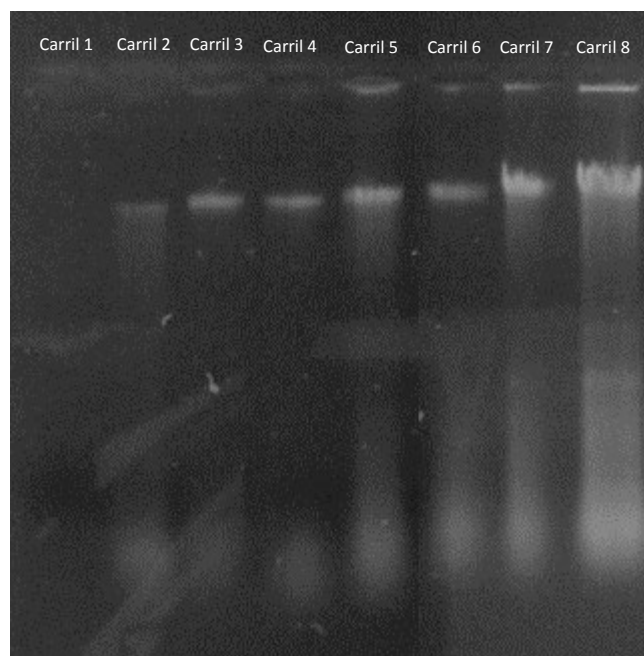


Fig. 20. Evaluación de la integridad del ADN de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Carril 1: Control Negativo; Carril 2: cepa HD-500; Carril 3: cepa H14; Carril 4: cepa *Bacillus thuringiensis* Chil.A; Carril 5: cepa *Bacillus thuringiensis* ChiVI.B; Carril 6: *Bacillus thuringiensis* LimVII.A; Carril 7: *Bacillus thuringiensis* LimVIII.A; Carril 8: *Bacillus thuringiensis* LimVIII.E

TABLA 15. GENES *cry 4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa* DETECTADOS EN CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* NATIVOS Y SU MORTALIDAD PARA AEDES AEGYPTI DESPUES DEL BIOENSAYO CUALITATIVO

N°	CEPA	<i>cry4Aa</i>	<i>cry11Aa</i>	<i>cyt1Aa</i>	MORTALIDAD (%) 24 horas
1	<i>Bacillus thuringiensis</i> Chil.A	+	+	+	100
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> ChiVI.B	-	+	+	100
3	<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVII.A	-	+	+	100
4	<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.A	-	+	+	100
5	<i>Bacillus thuringiensis</i> LimVIII.E	-	+	+	100
6	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-500	+	+	+	100
7	<i>Bacillus thuringiensis</i> H-14	+	+	+	100

+: gen amplificado

-: gen no amplificado

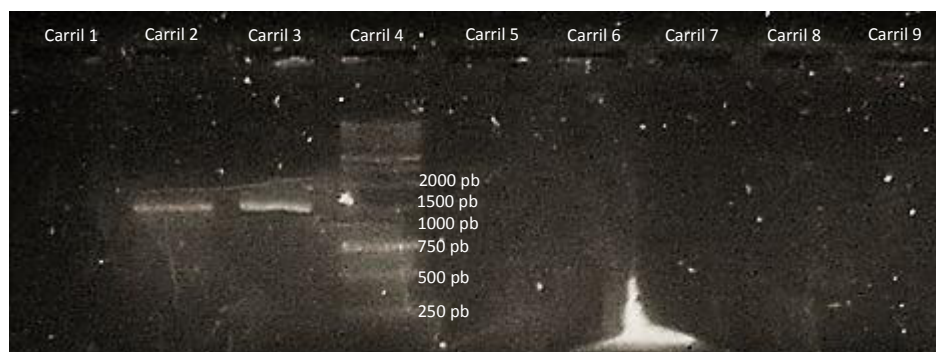


Fig. 21. Amplificación del gen *cry4Aa* de las cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas. Carril 1: Control negativo; Carril 2: *Bacillus thuringiensis* HD-500; Carril 3: *Bacillus thuringiensis* H14; Carril 4: Marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Promega); Carril 5: *Bt* Chil.A, Carril 6: *Bt* ChiVI.B; Carril 7: *Bt* LimVII.A, Carril 8: *Bt* LimVIII.A; Carril 9: *Bt* LimVIII.E

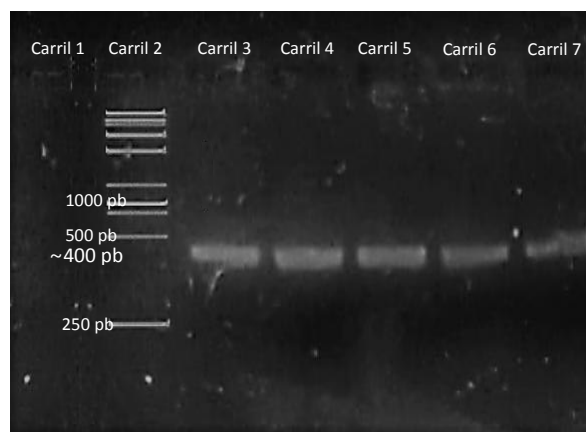


Fig. 22. Amplificación del gen *cry11Aa* de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Ladder 1Kb Promega; Carril 3: *Bt* Chil.A, Carril 4: *Bt* ChiVI.B; Carril 5: *Bt* LimVII.A, Carril 6: *Bt* LimVIII.A; Carril 7: *Bt* LimVIII.E.

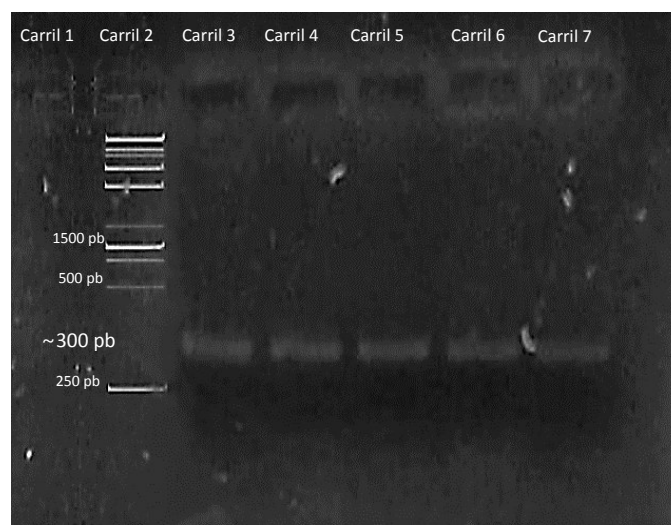


Fig. 23. Amplificación del gen *cyt1Aa* de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Ladder 1Kb; Carril 3: *Bt* Chil.A, Carril 4: *Bt* ChiVI.B; Carril 5: *Bt* LimVII.A, Carril 6: LimVIII.A; Carril 7: *Bt* LimVIII.E.

6. DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que solo el 22% de las muestras analizadas (agua, tierra y larvas muertas) fueron positivas para *Bacillus thuringiensis* cristalíferos con un total de 7 muestras positivas, este es un valor semejante a lo reportado por Iriarte et al. (1998) que indica que el porcentaje de muestras con presencia de *Bt* oscila entre el 20 y el 30%. Por otro lado, autores como Carreras (2009) indican valores de 82.5 % de muestras positivas; incluso Hossain et al. (1997) encontraron 100% de muestras positivas para *Bt* en los suelos de Bangladesh. Los valores reportados por Carreras y Hossain son mucho más altos que los reportados en este estudio sin embargo la riqueza de muestras con *Bt* podría deberse al tipo de suelo ya que Hossain et al. (1997) demostró que las propiedades del suelo afectaban la abundancia y distribución de *Bt*. Además, está el hecho de que los genes que codifican a la toxina se encuentran en plásmidos, por lo cual las cepas presuntivas para *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis* en realidad se traten de cepas acristalíferas de *Bacillus thuringiensis* (Drobniewski, 1994).

Martin y Travers (1989) señalan que la presencia de insectos no predice la presencia de *B. thuringiensis* en una muestra de suelo particular, esto coincide con este estudio para el caso de la ecoregión Piura ya que allí, ha existido problemas con el vector y sin embargo no se ha hallado ninguna cepa con propiedad entomocida en las 24 muestras tomadas de la ecoregión Piura en los Distritos de Catacaos, Sullana y Morropón, sin embargo, quizás esto se vio influenciado por otros factores del lugar como lo señala Hossain (2007). Para el caso de la ecoregión Chiclayo y Lima también se han reportado casos de dengue y por ende

ha tenido que existir el vector, en estas ecoregiones si se hallaron cepas con actividad larvicida, sin embargo, esto como ya se mencionó al parecer no es un factor determinante.

Por otra parte, la mayor incidencia de *Bt* en todas las muestras de agua recolectadas (29%) quizás se deba al mayor número de muestras procesadas en comparación a las de tierra y larvas muertas (ver tabla 3) sin embargo se tomaron este tipo de muestras porque se querían cepas con actividad larvicida, precisamente este estudio concuerda con lo reportado por Ichimatsu et al. (2000), quien señala que la actividad larvicida contra los dípteros acuáticos se asoció con aproximadamente el 27% de los aislamientos acuáticos de *B. thuringiensis*. En este estudio se obtuvo un valor más alto, 55.5 % de cepas entomocidas para *Aedes aegypti*. Esto parece indicar que las muestras de agua son ideales para hallar cepas con actividad larvicida para *Aedes aegypti*.

En este estudio sólo se han hallado 9 cepas de *Bt* a partir de las 80 cepas aisladas y analizadas por el método de Travers (1987). Esto indica una incidencia del 11.3% (ver Tabla 4) lo cual es un valor bajo en comparación a lo reportado por Carreras (2009) ya que encontró una incidencia del 56% de *Bt* en todos sus aislamientos.

Aun así, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que efectivamente, *Bacillus thuringiensis* es una bacteria cosmopolita, hallada también en los departamentos de Piura, Chiclayo y Lima

Respecto a la morfología del cristal, Höfte y Whiteley (1989), demostraron que las cepas que tienen inclusiones de cristales esféricos, como las presentes en *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, pueden contener proteínas tóxicas para

dípteros. En este estudio, los resultados concuerdan con lo dicho por Höfte y Whiteley ya que la presencia de cristales esféricos se correlacionó en un 100% con la actividad larvica presentada por las cepas nativas. Así mismo, los cristales circulares con apariencia de gorro no demostraron ninguna actividad larvica para *Aedes aegypti*, pero podría tener actividad contra otras especies de mosquitos. Huertas (2013) encontró 2 cepas con actividad larvica para *Aedes aegypti* (6% de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* obtenidas) provenientes de los departamentos de Cajamarca e Ica, sin embargo, en el presente estudio, se encontraron 5 cepas con actividad larvica lo que representa un 55,5% de las cepas sometidas al bioensayo, éste es un valor mayor al encontrado por Huertas, estas diferencias en porcentajes de Bt con propiedades entomocidas para *Aedes aegypti* puede quizás explicarse por la naturaleza de las muestras ya que Huertas analizó sólo muestras de tierra mientras que en éste estudio se analizaron muestras de agua y tierra. Además, la mortalidad de las cepas evaluadas a las 24 horas, por Huertas, fue baja del 92 y 84 % respectivamente, en comparación con éste estudio en el cual se halla una mortalidad alta (100%) también evaluadas a las 24 horas, esto puede explicarse quizás a la concentración del inóculo usado para el bioensayo cualitativo, el cual no es precisado en aquel estudio pero que en el presente fue 5 mg/ml. Se podría pensar que los valores bajos de mortalidad en el ensayo cualitativo, reportados por la autora, se debe al inóculo, sin embargo, al contrastar los valores LC50 de las cepas, 67 y 83 ng/ml respectivamente con los valores de éste estudio, 4.55, 5.9, 7.5 ng/ml, efectivamente son valores mucho más altos que los reportados en el presente por lo que se podría decir que las cepas nativas halladas son más tóxicas que las reportadas por Huertas.

Respecto a las LC 50 halladas para la cepas nativas, la cepa *Bt* ChiVI.B era 4.55 ng/ml siendo 1.6 veces más bajo que el valor LC50 de la cepa patrón *Bt* HD-500 (7.535 ng/ml). Autores como Delgado (2011), también han reportado cepas con actividades LC50 de 13.2 y 10.82 ng/ml los cuales eran semejantes a la cepa patrón utilizada de 9.43ng/ml. Por otra parte cabe indicar que autores como Abbas y Rauf (2010), encontraron cepas con LC 50 de 34- 81ug/ml, los LC en éste estudio se han considerado en ng/ml lo cual indicaría que las cepas tiene mayor toxicidad sin embargo el protocolo usado por Abbas y Rauf (2010) solo dejó esporular por 24 horas en el medio T3 mientras que en éste estudio se dejó esporular por 1 semana en el medio LB. Los factores como el medio de esporulación y el tiempo quizá condujo a valores diferentes.

Los genes *cry11Aa* y *cyt1Aa* se hallaron en todas las cepas nativas sin embargo el gen *cry4Aa* solo se encontró en la cepa *Bacillus thuringiensis* *Chil.A*.

Es probable que la actividad larvicida hallada en las cepas nativas se deba no solo a la presencia de los genes *cry11Aa* y *cyt1Aa* sino también a los genes *cry4Bb*, y *cry10Aa* no evaluados en este estudio. Se necesitan estudios adicionales para identificar esos genes y corroborar esta hipótesis. El-Kersh et al. (2016), hallaron una cepa “*Bt* 63” que contenía los genes *cry4Ba* , *cry10Aa* , *cry11A* , *cyt1Aa* y *cyt2Aa* , pero que carecía del gen *cry4A*. También en Irán, Jouzani y col. aislaron 128 cepas de *Bt* de diferentes regiones ecológicas de Irán con toxicidad específica para dípteros y detectaron *cry4Bb* en 60% de los aislados y *cry4C* y *cry4D* en 40% de los aislados, mientras que *cry4Aa* no se detectó en ninguna cepa.

7. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 9 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en muestras de aguas estancadas de las cuales 5 poseen propiedades entomocidas para *Aedes aegypti* provenientes de las ecoregiones de Lambayeque y Lima.
2. Las cepas nativas *Bt* Chil.A, *Bt* ChiVI.B y *Bt* LimVII.A aisladas del Distrito Leonardo Ortiz (Chiclayo) y del Distrito de Chorrillos, Pantanos de Villa (Lima), poseen alta toxicidad.
3. Las cepas nativas *Bt* ChiVI.B, *Bt* LimVII.A, *Bt* LimVIII.A y *Bt* LimVIII.E con propiedades entomocidas poseen los genes *cry11Aa* y *cyt1Aa* pero carecen del gen *cry4Aa* mientras que la cepa *Bt* Chil.A posee los genes *cry4Aa*, *cry11Aa* y *cyt1Aa*.

8. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar las investigaciones para identificar y describir los genes asociados a la producción de toxinas insecticidas de las cepas nativas aisladas que no fueron detectados en éste estudio.
2. Se recomienda evaluar el potencial entomocida de las cepas nativas *Bt* CatNa2.A.1, *Bt* CatNa2.A.2, *Bt* CatNa5.A.1 y *Bt* SulMa16A.1, que no presentaron potencial larvicida contra *Aedes aegypti*, para otros ordenes de insectos.
3. Se recomienda realizar más aislamientos de cepas de *Bt* con un número mayor de muestras a las utilizadas en este estudio, en los distritos de Catacaos, Sullana, Morropón (Piura), Leonardo Ortiz (Chiclayo) y en el Distrito de Chorrillos, Pantanos de Villa (Lima).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ANGUS, T.A., 1956. Association of toxicity with protein crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. Can. J. Microbiol., 2: 122-1
2. BALAKRISHNAN, S., INDIRA, K., & SRINIVASAN, M. (2015). Mosquitocidal properties of *Bacillus* species isolated from mangroves of Vellar estuary, Southeast coast of India. J Parasit Dis, 39(3), 385-392.
3. BEN- DOV E., 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Tis Dipteran-Specific Toxins. Toxins ISSN 2072-6651 Vol 6, 1222-1243; doi: 10.3390/toxins6041222.
4. BERLINER, E., 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmoten- raupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n.sp. Z. Angew. Entomol., 2: 29-56.
5. BISSET J., RODRÍGUEZ M., FERNÁNDEZ D., PALOMINO M. 2007. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú. Rev Cubana Med Trop.; 59(3):202-8.
6. BISSET J., RODRÍGUEZ M., SAN MARTÍN J., ROMERO J., MONTOYA R. 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. Rev Panam Salud Publica; 26(3): 229–34.
7. BOYCE R., LENHART A., KROEGER A., R. VELAYUDHAN, B. ROBERTS, O. HORSTICK 2013. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. Trop Med Int Health. ;18(5):564-77.
8. BRAVO A, GILL SS, SOBERO´N M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, 49, 423–35.
9. BRAVO, A., GOMEZ, I., PORTA, H., GARCIA-GOMEZ, B. I., RODRIGUEZ-ALMAZAN, C., PARDO, L., & SOBERON, M. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microb Biotechnol, 6(1), 17-26.

10. BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S.S., SOBERÓN, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 423-431.
11. BROGDON W., MCALLISTER J.; 1998. Insecticide resistance and vector control. Emerg Infect Dis; 4(4): 605-13.
12. BULLA, L. A., KRAMER, K. J., & DAVIDSON, L. I. (1977). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. Journal of bacteriology, 130(1), 375-83.
13. CABEZAS C., FIESTAS V., GARCÍA M., MIRIAM PALOMINO , ENRIQUE MAMANI , FERNANDO DONAIRES. Dengue en el Perú: A un cuarto de siglo de su reemergencia. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015;32(1):146-56.
14. CARRERAS B. 2009. Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* Berliner autóctonos de Cuba. Fitosanidad vol. 13, no. 2, junio.
15. CHRISTOPHERS S. (1960). *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics, and structure. New York: Cambridge University Press;
16. CORONEL M., DOS SANTOS L., DE MELO C., BENTO J., GONZALEZ N. 2016. Perfil de susceptibilidad a Temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Ciudad del Este - Alto Paraná, Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, 14(2), 98-105
17. CRICKMORE, N., BONE E., WILLIAMS A., ELLAR D. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiology Letters, 131(3): 249-254
18. DE VOS P., GARRITY, G. M., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., RAINEY, F. A., & WHITMAN, A.-H. S. A. W. B. (1984-1988). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 3).
19. DELGADO J. 2011. "Aislamiento y Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad mosquitocida nativas de Oaxaca" TESIS para optar el grado de Maestro en Ciencias, IPN – CIIDIR – OAXACA, México.

20. DOS SANTOS K., SOARES J., CLEONEIDE M., PEDRO W., POLANCZYC R. Y SOARES V. 2018. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae Rev. Brasileira de Entom. 62: 5-12
21. DROBNIEWSKI F. A. (1994). The safety of *Bacillus* species. Journal of Applied Bacteriology, 76, 101-109.
22. EL-KERSH, T. A., AHMED, A. M., AL-SHEIKH, Y. A., TRIPET, F., IBRAHIM, M. S., & METWALLI, A. A. (2016). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). Parasit Vectors, 9(1), 647.
23. FLORES A., EGÚSQUIZA R., ALCARRAZ M., WOOLCOTT J., BENAVIDES E., GODOY J., HUERTA D., JESUS Y., PATIÑO A., 2011. Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. Ciencia e Investigación; 14(1): 29-34
24. FRANKENHUYZEN, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. J. Invertebr. Pathol. 101, 1-16.
25. GOLDBERG, L. AND MARGALIT, J., 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News, 37: 355-358.
26. GÓMEZ G. (2018). *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae) y su importancia en salud humana. Revista Cubana de Medicina Tropical, 70(1)
27. GONZÁLEZ G. 2013 "Resistencia a insecticidas en el mosquito vector del dengue *Aedes aegypti* (L) en dos épocas de transmisión de la enfermedad en Mérida, Yucatán." Tesis de Posgrado. Universidad autónoma de nuevo león facultad de ciencias biológicas división de estudios de Posgrado.

28. GONZALEZ, A., DIAZ, R., DIAZ, M., BORRERO, Y., BRUZON, R. Y., CARRERAS, B., & GATO, R. (2011). Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. *Rev Biol Trop*, 59(3), 1007-1016.
29. GUZMÁN, J. (2017). Situación Epidemiológica de dengue en el Perú. *Boletín epidemiológico del Perú*. Recuperado de
30. HARRISON B. Y RATTANARITHIKU R. 1973. Comparative Morphology of the Early Larval Instars of *Aedes aegypti* and *A. seatoi* in Thailand. *Mosquito systematics*. 5 (4), 280-294.
31. HÖFTE H AND WHITELEY H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*. 53:242–255.
32. HÖFTE, H., WHITELEY, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev*. 53, 242-255.
33. HOSSAIN M, AHMED S., AND HOQUE S. 1997. Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural Soil of Bangladesh. *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY* 70, 221–225 (1997)
34. HUERTAS D. 2013. Caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades entomocidas, para vectores transmisores de enfermedades metaxénicas (dengue). Tesis doctoral. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Lima, Perú.
35. ICHIMATSU, T., MIZUKI, E., NISHIMURA, K., AKAO, T., SAITOH, H., HIGUCHI, K., & OHBA, M. (2000). Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Current Microbiology*, 40(4), 217-220.
36. IRIARTE, J., BEL, Y., D. FERRANDIS, M., ANDREW, R., MURILLO, J., FERRÉ, J., & CABALLERO., P. (1998). Environmental Distribution and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(1), 97-106.
37. ISHII T., OHBA M., 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* environmental isolates showing larvicidal activity specific for mosquitoes. *Journal of General Microbiology*, 139, 2849-2854.

38. LA DUC MT, SATOMI M, AGATA N, VENKATESWARAN K (2004) *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. J Microbiol Methods 56:383–394
39. LIANG, H., LIU, Y., ZHU, J., GUAN, P., LI, S., 2011. Characterization of *cry2*-type genes of *Bacillus thuringiensis* strains from soil-isolated of Sichuan basin, China. Braz. J. Microbiol. 42, 140-146.
40. MANASHEROB, R., BEN-DOV, E., ZARITSKY, A., & BARAK, Z. (1998). Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Applied and environmental microbiology, 64(5), 1750-8.
41. MANCEBO A., GONZALES B., RIERA L., LUGOS., GONZALES Y., ARTEAGA M., FUENTES D., 2003. Evaluación de la toxicidad/ patogenicidad de una formulación de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bactivec). Revista de Toxicología, Asociacion española de Toxicología vol. 20 num. 3, 2003, pp.204-209. Pamplona, España.
42. MARTIN P A W, TRAVERS R S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol.; 55:2437–2442.
43. MATTINGLY P., STONE A., KNIGHT K. (1962). *Culex aegypti* Linnaeus, 1762 (Insecta, Diptera); proposed validation and interpretation under the plenary powers of the species so named. Z.N.(S.) 1216. Bull Zool Nomencl.19(4):208-19.
44. MELO, A. L., SOCCOL, V. T., & SOCCOL, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. Critical Reviews in Biotechnology, 36(2), 317-326.
45. MITTAL P. K., 2003. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. Journal of Vector Borne Diseases 40, March-June, pp 20-32.
46. OMS. (1999). Microbial Pest Control Agent. *Bacillus thuringiensis*. Recuperado de <https://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/EHC217.PDF?ua=1>

47. OMS. (2018). Dengue y dengue grave. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
48. PALMA L., MUÑOZ D., BERRY C., MURILLO J., CABALLERO P., 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. Toxins ISSN 2072-6651. VOL 6, 3296-3325; doi: 10.3390/toxins6123296.
49. PALOMINO, M.; SOLARI, L.; LEÓN, W.; VEGA, R.; VERGARAY, C.; CUBILLAS, L.; MOSQUEDA, C.; & GARCÍA, A. (2006). Evaluación del efecto residual del Temephos en larvas de *Aedes aegypti* en Lima, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 23(3), 158-162.
50. PARDO-LÓPEZ L, MUÑOZ-GARAY C, PORTA H, ET AL. (2009). Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Peptides, 30, 589–95.
51. PARK, H.W., DEVERA, J.A., PRINS, B.A., BIDESHI, D.K., 2011. The dual-activity insecticidal protein, Cry2Aa, does not enhance the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelenses*. J. Asia Pac. Entomol. 14, 429-431.
52. PÉREZ C., FERNANDEZ L, SUN J., FOLCH J., GILL S., SOBERÓN M., AND BRAVO A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. PNAS, December 20, 2005, vol. 102, no. 51 18303–18308
53. PÉREZ, M. (2017). Evaluación del temefos y pyriproxifeno para el control de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. Horizonte Médico, 17(4).
54. POOPATHI S., THIRUGNANASAMBANTHAM K., MANI C., RAGUL K., SUNDARAPANDIAN S., 2014. Isolation of mosquitocidal Bacteria (*Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus* and *B. cereus*) from excreta of arid birds. Journal of Experimental Biology. Vol 52, July pp. 739-747.

55. PRAZANNA A., XAVIER R., REENA J., LEE Y., MARIMUTHU K., KATHIRESAN S., SREERAMANAN S., 2011. Mosquitocidal activity of a native *Bacillus thuringiensis* isolate Bt ReX02 from Gunung Jerai Forest, Malaysia against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, vol 15 pp. 149-455.
56. RABINOVITCH, L., VIVONI, A. M., MACHADO, V., KNAAK, N., BERLITZ, D. L., POLANCZYK, R. A., & FIUZA, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects In L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk, & N. Crickmore (Eds.), *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol (pp. 1-18): Springer International Publishing.
57. RICHARD J., 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. Agriculture, Ecosystems and Environment 49: 9-13
58. RODRÍGUEZ, MARÍA MAGDALENA, BISSET, JUAN A., FERNÁNDEZ, DITTER, & PÉREZ, Omayda. (2004). Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. Revista Cubana de Medicina Tropical, 56(1), 54-60.
59. SAUKA, D., and BENINTENDE, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología, 40, 124-140.
60. SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., . . . DEAN, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 62(3), 775-806.
61. SCHÜNEMANN R., KNAAK N., AND FIUZA L. 2014. Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture,” ISRN Microbiology, vol., Article ID 135675, 12 pages.

62. SOARES J., SOARES P., LITAIF E., POLACZYK R., TADEI W., 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 59, 1-6. Brazil.
63. SOBERÓN M, PARDO L, MUÑOZ-GARAY C, ET AL. (2010). Pore formation by Cry toxins. In: Anderluh G, Lakey JH, eds. *Proteins: membrane binding and pore formation*. New York: Springer.
64. TENSSAY Z., ASHENAFI M., EILER A., BERTILSON S., 2009. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* from soils in contrastin agroecological zones of Ethiopia. *Ethiopian Journal of Science.*, 32(2): 117-128.
65. TOKCAER, Z., BAYRANKTAR, E., MEHMETOĞLU, U., ÖZCENGİZ, G., ALAEDDINOĞLU, N.G., 2006. Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD 500. *Process Biochem.* 41, 350-355.
66. TRAVERS, R. S., MARTIN, P. A. W., & REICHELDERFER, C. F. (1987). Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 53(6), 1263-1266.
67. WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Communicable disease control, prevention and eradication who pesticide evaluation scheme.
68. ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO, N. B., ROSE-YOUNG, L., & BULLA, L. A., JR. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 12(11), 1407-1416.

ANEXO I

Extracción de ADN de *Bacillus thuringiensis*

1. Sembrar en LB por 24 horas a 30°C
2. Centrifugar a 4500 RPM x 15 minutos
3. Lavar con solución salina
4. Resuspender en 250ul de TE (20:5 mM) y centrifugar a 13000 RPM x 5 min
5. Descartar el sobrenadante
6. Resuspender en 120 ul de TE (20:5nM)
7. Adicionar 12ul de Lisozima (40mg/ml)
8. Incubar x 1h a 37°C
9. Añadir 6ul de SDS 20%
10. Incubar por 20 min a 70°C
11. Adicionar 1.5ul de RNAasa (10mg/ml) 1h a 37°C
12. Agregar 1.8 ul de Proteinasa K (10mg/ml) 60°C por 1 hora
13. Agregar cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 v/v
14. Centrifugar a 13000 rpm x 15 min a 4°C
15. Tomar el sobrenadante de la fase superior
16. Precipitar con Acetato de Amonio al 2,5 M
17. Agregar Isopropanol.
18. Centrifugar a 13000 rpm x 20 min a 4°C
19. Descartar el sobrenadante
20. Lavar el pellet con 200ul de etanol al 70% TE 20:5 a 13000 RPM x 10 min a 4°C
21. Lavar el pellet con 200ul de etanol al 70% TE 20:5 a 13000 RPM x 10 min a 4°C
22. Lavar con 200ul de etanol 70% H₂O a 13000 RPM x 10 min a 4°C
23. Secar a 57°C por 3 horas
24. Resuspender el ADN en 100ul de buffer TE 20:1
25. Guardar a -20°C

ANEXO II. ZONAS DE MUESTREO



Fig. 24. Muestreo de agua empozada en el departamento de Piura, distrito de Catacaos-Narihualá



Fig. 25. Muestreo de agua de cultivo de arroz en el departamento de Piura, distrito de Sullana-Marcavelica.



Fig. 26. Muestreo de agua empozada en la ciudad de Piura, distrito de Sullana-Marcavelica



Fig. 27. Muestreo de agua empozada en la ciudad de Piura, distrito de Querocotillo.

ANEXO III. BIOENSAYOS

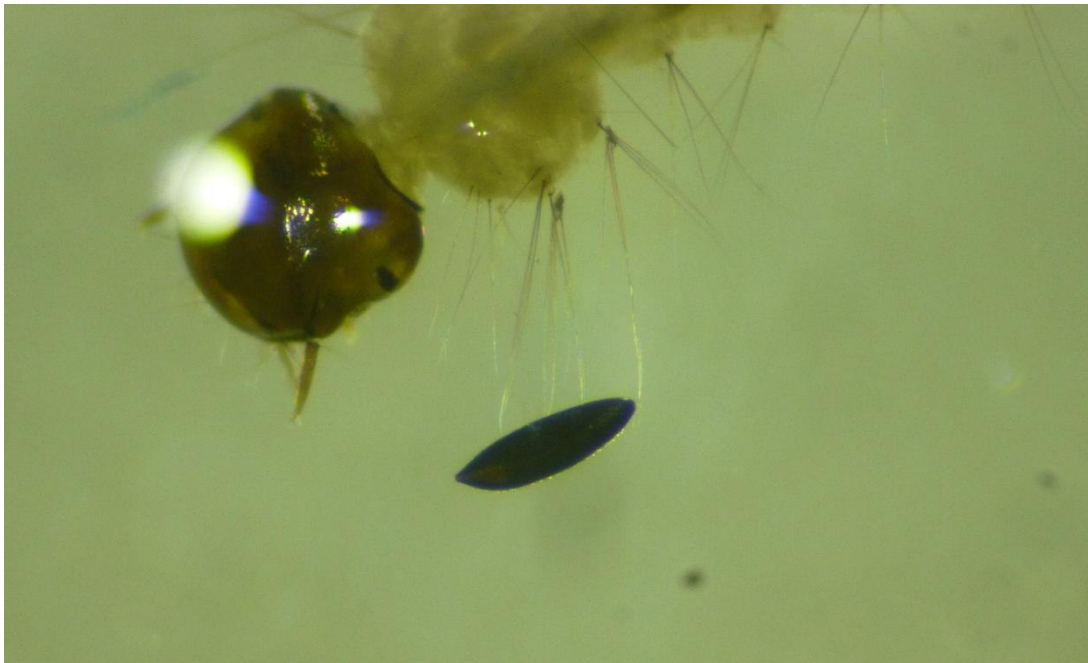


Fig. 28. *Huevo de Aedes aegypti.* Se observa la forma ovalada la coloracion negra. Material biológico proporcionado por el INS.

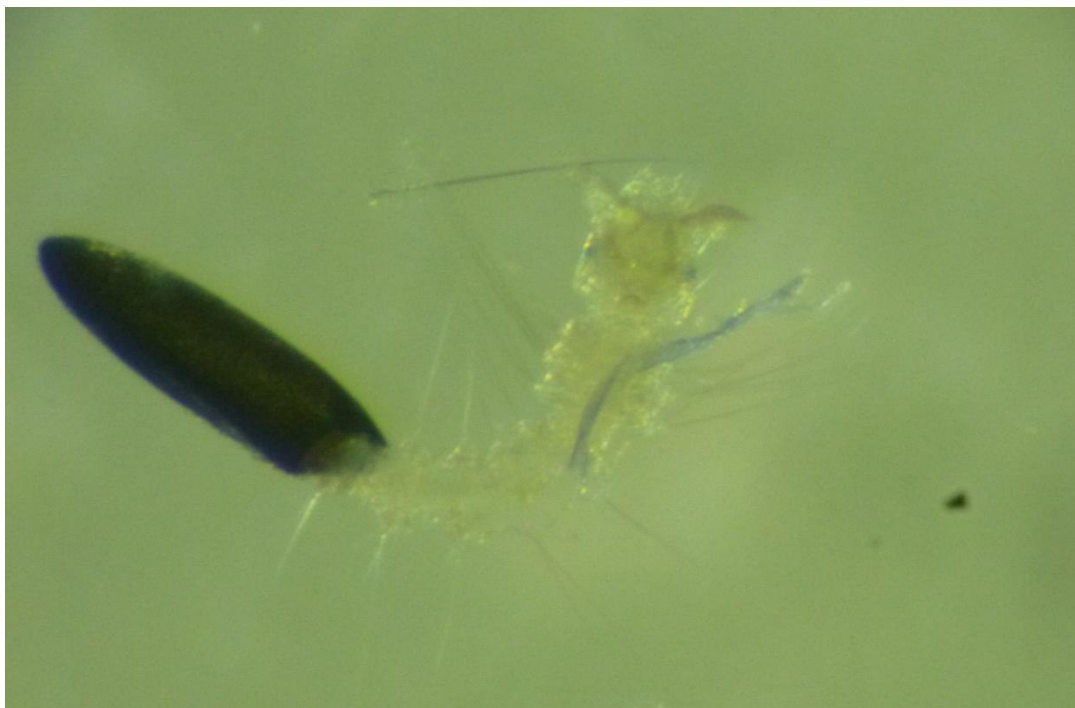


Fig. 29. *Huevo de Aedes aegypti.* Se observa una larva del primer estadio saliendo del huevo. Material biológico proporcionado por el INS.



Fig. 30. Larva del tercer estadio de *Aedes aegypti*. Se observa la esclerotización del sifón hasta un poco mas de la mitad y la hilera de dientes presente en el octavo segmento. Estadío utilizado para los bioensayos. Foto tomada del material biológico proporcionado por el INS.



Fig. 31. Bioensayo



Fig. 32. Evaluación de la mortalidad larvaria después de 24 horas de bioensayo.

ANEXO IV.

MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* con las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla 16. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt Chila* PARA LA DILUCIÓN -3.

DILUCIÓN N -3	CONCENTRACIÓN N MADRE 1 x 10 ⁴ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN N FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	40	25	25	25	25	100
300	30	25	25	25	25	100
200	20	25	25	25	25	100
100	10	25	25	25	24	99
80	8	24	25	24	24	97
50	5	15	10	12	11	48

Tabla 17. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt Chila* PARA LA DILUCIÓN -4.

DILUCIÓN -4	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ³ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	4	0	0	0	0	0
300	3	0	0	0	0	0
200	2	0	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0	0
80	0.8	0	0	0	0	0
50	0.5	0	0	0	0	0

Tabla 18. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt ChiVIA* PARA LA DILUCIÓN -3.

DILUCIÓN -3	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ⁴ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	40	25	25	25	25	100
300	30	25	25	25	25	100
200	20	25	25	25	25	100
100	10	25	25	25	25	100
80	8	25	25	25	25	100
50	5	22	20	22	22	86

Tabla 19. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt ChiVIA* PARA LA DILUCIÓN -4.

DILUCIÓN -4	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ³ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	4	2	2	1	1	6
300	3	0	0	0	0	0
200	2	0	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0	0
80	0.8	0	0	0	0	0
50	0.5	0	0	0	0	0

Tabla 20. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt LimVIIA* PARA LA DILUCIÓN -3

DILUCIÓN -3	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ⁴ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	40	25	25	25	25	100
300	30	25	25	25	25	100
200	20	25	25	25	25	100
100	10	24	25	24	24	97
80	8	15	14	14	15	58
50	5	2	2	3	1	8

Tabla 21. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt LimVIIA* PARA LA DILUCIÓN -4.

DILUCIÓN -4	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ³ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACION FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	4	0	0	0	0	0
300	3	0	0	0	0	0
200	2	0	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0	0
80	0.8	0	0	0	0	0
50	0.5	0	0	0	0	0

Tabla 22. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt LimVIII*E para la dilución -1

DILUCIÓN -1	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ⁶ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	4000	25	25	25	25	100
300	3000	25	25	25	25	100
200	2000	25	25	25	25	100
100	1000	25	25	25	25	100
80	800	25	24	24	23	96
50	500	2	2	1	2	7

Tabla 23. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt LimVIII*E para la dilución -2

DILUCIÓN -2	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ⁵ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	400	0	0	0	0	0
300	300	0	0	0	0	0
200	200	0	0	0	0	0
100	100	0	0	0	0	0
80	80	0	0	0	0	0
50	50	0	0	0	0	0

Tabla 25. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt LimVIII E* para la dilución -3

DILUCIÓN -4	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ³ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	40	0	0	0	0	0
300	30	0	0	0	0	0
200	20	0	0	0	0	0
100	10	0	0	0	0	0
80	8	0	0	0	0	0
50	5	0	0	0	0	0

Tabla 24. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA NATIVA *Bt LimVIII E* para la dilución -4

DILUCIÓN -4	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ³ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	4	0	0	0	0	0
300	3	0	0	0	0	0
200	2	0	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0	0
80	0.8	0	0	0	0	0
50	0.5	0	0	0	0	0

Tabla 26. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA PATRÓN *Bt HD-500* para la dilución -3

DILUCIÓN -3	CONCENTRACIÓ N MADRE 1 x 10 ⁴ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓ N FINAL ng/ml	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	40	25	25	25	25	100
300	30	25	25	25	25	100
200	20	25	25	25	25	100
100	10	25	25	25	24	99
80	8	15	16	15	18	64
50	5	0	1	1	0	2

Tabla 27. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE MORTALIDAD LARVARIA DE *Aedes aegypti* CON LA CEPA PATRÓN *Bt HD-500* para la dilución -4

DILUCIÓN -4	CONCENTRACIÓN MADRE 1 x 10 ⁴ ng/ml	Número de larvas muertas (24horas)				% Mortalidad Promedio
Inóculo (ul)	CONCENTRACIÓN FINAL ng/ml	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
400	4	0	0	0	0	0
300	3	0	0	0	0	0
200	2	0	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0	0
80	0.8	0	0	0	0	0
50	0.5	0	0	0	0	0

ANEXO V

TABLA 28. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DE LA CEPA NATIVA *Bt Chil.A* CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADIO *Aedes aegypti* MEDIANTE EL ANÁLISIS PROBIT

Límites de confianza			
CONCENTRACION LETAL	95% de límites de confianza para dosis		
	Concentracion (ng/ml)	Límite inferior	Límite superior
LC1	3.128	-1.303	4.317
LC5	3.954	0.906	4.967
LC10	4.394	2.020	5.377
LC15	4.691	2.725	5.701
LC50	5.947	4.927	7.847
LC85	7.203	6.103	11.020
LC90	7.500	6.328	11.824
LC95	7.940	6.644	13.032
LC99	8.765	7.207	15.329

Tabla 29. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DE LA CEPA NATIVA *Bt ChiVI.B* CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADIO *Aedes aegypti* MEDIANTE EL ANÁLISIS PROBIT

Límites de confianza			
CONCENTRACION LETAL	95% de límites de confianza para DOSIS		
	Concentracion (ng/ml)	Límite inferior	Límite superior
LC1	3.650	3.225	3.912
LC5	3.916	3.575	4.129
LC10	4.057	3.760	4.246
LC15	4.153	3.884	4.326
LC50	4.556	4.395	4.679
LC85	4.960	4.844	5.093
LC90	5.055	4.936	5.204
LC95	5.196	5.067	5.376
LC99	5.462	5.297	5.713

Tabla 30. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DE LA CEPA NATIVA *Bt LimVII.A* CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADIO *Aedes aegypti* MEDIANTE EL ANÁLISIS PROBIT

Límites de confianza			
CONCENTRACION LETAL	95% de límites de confianza para dosis		
	Concentracion (ng/ml)	Límite inferior	Límite superior
LC1	4.011	-7.143	6.099
LC5	5.035	-3.821	6.726
LC10	5.580	-2.056	7.066
LC15	5.948	-0.869	7.299
LC50	7.505	4.071	8.364
LC85	9.061	8.115	10.324
LC90	9.429	8.631	11.229
LC95	9.974	9.172	12.793
LC99	10.998	9.934	15.979

Tabla 31. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DE LA CEPA NATIVA *Bt LimVIII.E* CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADIO *Aedes aegypti* MEDIANTE EL ANÁLISIS PROBIT

Límites de confianza			
CONCENTRACION LETAL	95% de límites de confianza para dosis		
	Concentración (ng/ml)	Límite inferior	Límite superior
LC1	410.493	347.023	457.929
LC5	475.613	423.493	516.088
LC10	510.329	463.634	547.718
LC15	533.751	490.374	569.401
LC50	632.789	598.919	665.604
LC85	731.826	697.957	771.313
LC90	755.249	720.112	797.582
LC95	789.964	752.298	837.165
LC99	855.085	811.153	912.940

Tabla 32. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DE LA CEPA PATRÓN HD-500 CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADIO *Aedes aegypti* MEDIANTE EL ANÁLISIS PROBIT

Límites de confianza				
CONCENTRACION LETAL		95% de límites de confianza para dosis		
		Concentracion (ng/ml)	Límite inferior	Límite superior
	LC1	4.854	0.335	6.165
	LC5	5.639	2.089	6.676
	LC10	6.058	3.023	6.950
	LC15	6.340	3.653	7.136
	LC50	7.535	6.290	7.944
	LC85	8.729	8.445	9.235
	LC90	9.012	8.702	9.793
	LC95	9.430	9.018	10.685
	LC99	10.216	9.555	12.414

